

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «АНАЛІЗ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНОГО ФАКТОРА
КРОВІ RFXIII»**

Виконала: здобувачка вищої освіти 2 курсу групи ПБтм24(1,6д)
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Марія ВІНОКУРОВА

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, к. фарм. н., доц.
Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент:

Начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ “БІОЛІК
ФАРМА”, к.фарм.н., с.н.с. Олена НАЗАРОВА

АНОТАЦІЯ

Проведено комплексний аналіз системи коагуляції крові, препаратів факторів згортання, характеристики FXIII та біотехнологічних методів його виробництва. На основі літературних даних та схеми прийняття рішень обґрунтовано вибір дріжджової системи експресії *Saccharomyces cerevisiae*, враховуючи відсутність потреби в глікозилюванні, високий вихід та економічність. Технологія включає клонування, підготовку середовищ, ферментацію з глюкозно-етанольним підживленням, лізис, багатоступінчасте очищення та отримання готової форми. Робота демонструє потенціал впровадження технології в Україні для подолання відсутності спеціалізованих препаратів FXIII, сприяючи доступності терапії та розвитку національної галузі. Загальний обсяг роботи – 81 стор., кількість рисунків 9, таблиць – 3, джерел літератури 84, додатків 1.

Ключові слова: рекомбінантний фактор XIII, *Saccharomyces cerevisiae*, системи експресії, технологія очищення, ферментація.

ABSTRACT

A comprehensive analysis of the blood coagulation system, coagulation factor preparations, the structural-genetic characteristics of FXIII, and biotechnological methods for its production has been performed. Based on literature data and a decision-making framework, the yeast system *Saccharomyces cerevisiae* was substantiated, given the absence of a requirement for glycosylation, high yield, and cost-effectiveness. The technology encompasses cloning, media preparation, fed-batch fermentation with glucose–ethanol feeding, cell lysis, multi-stage purification, and final product formulation. The work demonstrates the potential for implementing this technology in Ukraine to address the current lack of specialized FXIII preparations. The total volume of the work is 81 pages, including 9 figures, 9 tables, 84 literary sources, and 1 appendix.

Key words: recombinant factor XIII, *Saccharomyces cerevisiae*, expression systems, purification technology, fermentation.

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| Вступ | 5 |
| Розділ 1 Огляд літератури | 8 |
| 1.1 Фактори згортання крові у системі коагуляції крові | 8 |
| 1.2 Препарати крові та факторів згортання крові | 10 |
| Висновок до розділу 1 | 22 |
| Розділ 2 Об'єкти та методи досліджень | 24 |
| 2.1. Характеристика об'єктів дослідження | 24 |
| 2.2. Характеристика методів дослідження | 38 |
| Висновок до розділу 2 | 39 |
| Розділ 3 Експериментальна частина | 40 |
| 3.1 Обґрунтування системи експресії для виробництва rFXIII | 40 |
| 3.2 Обґрунтування технології виробництва rFXIII | 65 |
| Висновок до 3 розділу | 79 |
| Висновки | 81 |
| Список використаних джерел | 82 |
| Додаток. Публікації за темою роботи | 91 |

ВСТУП

Актуальність теми. Система коагуляції крові є фундаментальним механізмом гемостазу, де фактори згортання, забезпечують стабілізацію фібринового згустку та запобігають геморагічним ускладненням. Вроджений дефіцит FXIII, переважно субодиниці А, є рідкісним розладом (частота 1:2 млн), що призводить до тяжких кровотеч, внутрішньочерепних геморагій, уповільненого загоєння ран та рецидивуючих викиднів. Плазмові препарати FXIII (наприклад, Corifact, Fibrogammin P) ефективні, але несуть ризики вірусної контамінації та імуногенності, тоді як рекомбінантні аналоги (Tretten або NovoThirteen) забезпечують високу чистоту та безпеку. В Україні відсутні зареєстровані препарати FXIII, що ускладнює лікування, роблячи актуальним розробку вітчизняних біотехнологій для виробництва rFXIII. Зростання попиту на рекомбінантні фактори крові (ринок понад \$10 млрд) та обмеженість плазмових ресурсів підкреслюють необхідність оптимізації систем експресії та очищення для доступної терапії.

Метою роботи є обґрунтування біотехнології виробництва рекомбінантного фактора XIII (rFXIII) на основі аналізу структурно-генетичних характеристик FXIII та вибору оптимальної системи експресії для потенційного впровадження в Україні.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати систему коагуляції крові та препарати факторів згортання, з фокусом на FXIII.
2. Охарактеризувати структурно-генетичні особливості FXIII (субодиниці А та В, гени F13A1 та F13B).
3. Обґрунтувати вибір системи експресії для rFXIII-А на основі схеми прийняття рішень.
4. Обґрунтувати технологію виробництва rFXIII, включаючи ферментацію, очищення та отримання готової форми.

Об'єкти дослідження: фактор згортання крові XIII (FXIII), його субодиниці А та В, гени F13A1 та F13B, а також біотехнологічні системи експресії (*Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, клітини ссавців тощо).

Предметом дослідження є сучасні біотехнології отримання рекомбінантного фактора крові XIII.

Методами дослідження є системний аналіз наукової літератури (PubMed, Scopus, Web of Science), регуляторних даних (FDA, EMA, Державний реєстр лікарських засобів України), структурний аналіз та технологічне моделювання процесів виробництва на основі патентів та публікацій.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати мають практичне значення для розвитку української фармацевтичної галузі, так як запропонована технологія на базі *S. cerevisiae* дозволяє локальне виробництво rFXIII, що усуне відсутність спеціалізованих препаратів, знизить імпортозалежність та покращить доступність терапії рідкісних коагулопатій.

Апробація результатів дослідження і публікації. Окремі результати досліджень представлені на: Всеукраїнському конкурсі студентських наукових робіт (Диплом II місце), V міжнародній науково-практичній конференції Проблеми та досягнення сучасної біотехнології, 28 березня 2025 р., м. Харків, та VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, 10-11 грудня 2025 р., м. Харків, (Додаток) та опубліковані у матеріалах:

1. Характеристика рекомбінантних факторів крові VIII з подовженим періодом напіврозпаду / Винокурова М. Є., Калюжная О. С., Чернецький А. В. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали V міжнародної наук.-практ. конф. (28 березня 2025 р., м. Харків). – С. 148 – 149.

2. Vinokurova M.E. Trends in the development of production technologies for recombinant blood factor rFXIII. VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Youth pharmacy science», 10-11 грудня 2025 р., НФаУ. – Харків, 2025. – С. 223-224.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається зі вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 81 стор., кількість рисунків 9, таблиць – 3, джерел літератури 84, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Фактори згортання крові у системі коагуляції крові

Препарати факторів крові відіграють критичну роль у підтримці гемостазу – процесу зупинки кровотечі та запобігання надмірній втраті крові при пошкодженнях судин. Фактори згортання крові, такі як фібриноген, протромбін та інші (загалом 13 основних факторів), є білками, які синтезуються переважно в печінці та циркулюють у плазмі крові в неактивній формі. При травмі вони активуються в каскаді реакцій, що призводить до утворення фібринового згустку, який стабілізує тромбоцитарну пробку та сприяє загоєнню (рис. 1.1) [5, 14, 23].

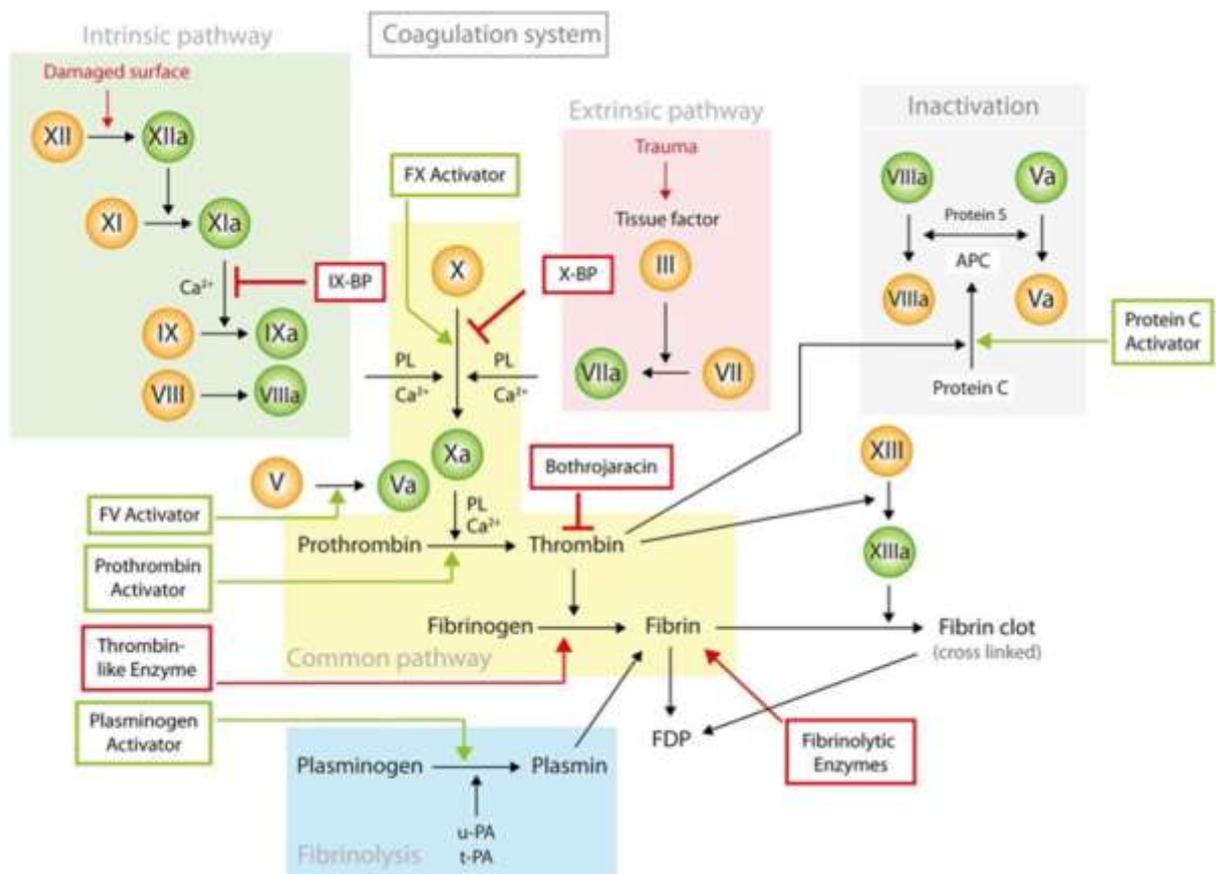


Рис. 1.1 – Схема системи коагуляції крові (Coagulation System): внутрішній шлях (Intrinsic Pathway), зовнішній шлях (Extrinsic Pathway), спільний шлях (Common Pathway), інактивація факторів коагуляції (Inactivation) та фібриноліз (Fibrinolysis). (Ілюстрація взята з [23])

Схема на рис. 1.1 представляє комплексну модель системи коагуляції крові, яка є частиною гемостазу – процесу, що запобігає крововтраті при пошкодженні судин. Схема ілюструє каскадну активацію факторів згортання крові, їх взаємодію з кофакторами (іонами кальцію Ca^{2+} , фосфоліпідами) та механізми регуляції для уникнення надмірного тромбоутворення. Фактори позначені римськими цифрами, а активовані форми – з літерою «а». Внутрішній шлях коагуляції активується при контакті крові з пошкодженою поверхнею судини, наприклад, колагеном субендотелію, без залучення зовнішніх тканинних факторів. Цей процес є повільнішим за зовнішній шлях і базується на факторах, що постійно циркулюють у плазмі. Ініціація починається з того, що пошкоджена поверхня активує фактор XII до стану XIIa через контактну активацію на негативно заряджених структурах. Далі XIIa за участю іонів кальцію перетворює фактор XI на XIa, який своєю чергою активує фактор IX до IXa. На наступному етапі IXa формує так званий «теназний комплекс» разом із кофактором VIIIa, іонами кальцію та фосфоліпідами з поверхні тромбоцитів, що призводить до активації фактора X у Xa. Додатково цей процес підтримується білком IX-VP та механізмом позитивного зворотного зв'язку, де тромбін активує фактор VIII. Паралельно діє зовнішній шлях, який є швидким і запускається травмою тканин, що вивільняє тканинний фактор (TF або фактор III). TF зв'язується з фактором VII, активуючи його до VIIa, після чого комплекс TF-VIIa разом із Ca^{2+} активує фактор X до Xa, де стабілізуючим елементом може виступати X-VP. Обидва шляхи сходяться у спільному шляху, де активований фактор Xa формує протромбіназний комплекс із кофактором Va, Ca^{2+} та фосфоліпідами. Цей комплекс перетворює протромбін (II) на тромбін (IIa), який розщеплює фібриноген на фібрин. Отриманий нестабільний згусток стабілізується фактором XIIIa, активованим тромбіном, що створює міцний перехресно-зшитий фібриновий тромб. Регуляція цього процесу включає активацію фактора V тромбіном та роботу тромбомодуліну на ендотелії, який змінює роль тромбіну на антикоагулянтну. Для запобігання надмірному

тромбоутворенню існує система інактивації: тромбін, зв'язаний з тромбомодуліном, активує протеїн С, який разом із протеїном S інактивує фактори Va та VIIa, пригнічуючи каскад. Після загоєння тканин настає фаза фібринолізу, під час якої плазміноген під дією t-PA або урокінази перетворюється на плазмін, що розщеплює фібрин на продукти деградації (FDP). Весь цей складний баланс забезпечується критичною наявністю Ca^{2+} та фосфоліпідів, а будь-які порушення, наприклад дефіцит фактора VIII при гемофілії або гіперактивація системи, призводять до кровотеч або тромбозів, що є основою для застосування антикоагулянтів у клінічній практиці [23, 42, 48].

1.2 Препарати крові та факторів згортання крові

До препаратів крові відносяться лікарські засоби, отримані з плазми крові людини (плазмові) або створені генетичною інженерією (рекомбінантні), які використовуються для замісної терапії при дефіцитах факторів згортання, імунодефіцитах, гіповолемії та інших станах [5, 7]. Без адекватної функції факторів згортання крові виникають серйозні порушення, такі як геморагічні діатези, гемофілія або дисеміноване внутрішньосудинне згортання (ДВЗ-синдром), що може призвести до масивних кровотеч, анемії та навіть летальних наслідків [5, 17, 48]. Наприклад, дефіцит фактора VIII спричиняє гемофілію А, а фактора IX – гемофілію В, де рівні факторів нижче 1% від норми призводять до спонтанних кровотеч [1, 17]. Препарати факторів крові, як плазмові, так і рекомбінантні, використовуються для замісної терапії, профілактики кровотеч під час операцій та реверсії антикоагулянтів [23, 84]. Їх важливість підкреслюється тим, що вони запобігають інфекціям (наприклад, гепатиту С або ВІЛ, які раніше передавалися через плазмові продукти) та забезпечують контроль над рідкісними вродженими дефіцитами. Впровадження цих препаратів значно покращило якість життя пацієнтів з коагулопатіями, зменшивши частоту госпіталізацій на 80-90% при

профілактичному використанні [5, 23, 24].

Рекомбінантні препарати факторів крові представляють собою генетично модифіковані білки, вироблені в системах експресії або клітинних лініях, без використання людської плазми, що усуває ризик передачі інфекцій, зокрема ВІЛ або гепатиту [4]. Технологія рекомбінантного виробництва, започаткована в 1980-х, революціонізувала лікування геморагічних розладів, забезпечуючи високу чистоту (понад 99%), стабільність та контрольоване глікозилювання, що покращує фармакокінетику (наприклад, подовжений період напіввиведення до 15-20 днів для деяких факторів). Перевагами рекомбінантних препаратів є: відсутність алергенів з плазми, можливість модифікацій (наприклад, для подовженої дії), та промислове масштабування [4, 13]. Рекомбінантні препарати зменшили імуногенність на 20-30% порівняно з плазмовими, але виробництво все ще залишається дороговартісним та має потенціал утворення інгібіторів у 10-15% випадків при первинному введенні [17, 34, 38]. Але вдосконалення технологій виробництва продовжується для ще кращої стабільності та доступності. Перелік препаратів крові плазмових та рекомбінантних, включно з препаратами факторів крові, на основі схвалень Food and Drug Administration (FDA) та European Medicines Agency (EMA) згруповано у табл. 1.1.

Таблиця 1.1 – Препарати крові, зареєстровано FDA та ЕМА

| Торгова назва | Діюча речовина | Лікарська форма | Застосування | Виробник |
|-------------------------|--|--------------------------------------|--|-------------|
| Плазмові | | | | |
| Alburex | Людський альбумін | Розчин для інфузії | Гіповолемія, гіпоальбумінемія, опіки, шок | CSL Behring |
| Albutein | Людський альбумін | Розчин для інфузії | Гіповолемія, гіпоальбумінемія, плазмообмін | Grifols |
| Buminate | Людський альбумін | Розчин для інфузії | Гіповолемія, опіки, асцит | Baxter |
| Flexbumin | Людський альбумін | Розчин для інфузії (мішок) | Гіповолемія, гіпоальбумінемія | Baxter |
| Human Albumin Baxter | Людський альбумін | Розчин для інфузії | Гіповолемія, опіки, захворювання печінки | Baxter |
| Plasbumin | Людський альбумін | Розчин для інфузії | Шок, опіки, гіпопротеїнемія | Grifols |
| Privigen | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) | Внутрішньовенний розчин | Первинний/вторинний імунодефіцит, аутоімунні захворювання (наприклад, ІТП, синдром Гійєна-Барре) | CSL Behring |
| Gamunex-C | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) | Внутрішньовенний/підшкірний розчин | Імунодефіцит, хронічна запальна демієлінізуюча полінейропатія | Grifols |
| Flebogamma DIF | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) | Внутрішньовенний розчин | Імунодефіцит, хвороба Кавасакі | Grifols |
| Gammagard S/D | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) | Порошок для внутрішньовенної інфузії | Імунодефіцит, профілактика інфекцій | Takeda |
| Hizentra | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) | Підшкірний розчин | Первинний імунодефіцит | CSL Behring |
| HyQvia | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) з гіалуронідазою | Підшкірний розчин | Первинний імунодефіцит | Takeda |
| Octagam | Людський нормальний імуноглобулін (IgG) | Внутрішньовенний розчин | Імунодефіцит, тромбоцитопенічна пурпура | Octapharma |
| Prolastin-C | Інгібітор альфа-1 протеїнази | Порошок для ін'єкції | Дефіцит альфа-1 антитрипсину (емфізема) | Grifols |
| Zemaira | Інгібітор альфа-1 протеїнази | Порошок для ін'єкції | Дефіцит альфа-1 антитрипсину | CSL Behring |

| | | | | |
|---------------|---|--------------------------------|--|------------------|
| Aralast NP | Інгібітор альфа-1 протеїнази | Порошок для ін'єкції | Дефіцит альфа-1 антитрипсину | Takeda (Baxalta) |
| Glassia | Інгібітор альфа-1 протеїнази | Розчин для інфузії | Дефіцит альфа-1 антитрипсину | Takeda |
| Octaplas | Людська плазма (оброблена розчинником/детергентом) | Заморожений розчин для інфузії | Порушення згортання, масивна трансфузія, плазмообмін | Octapharma |
| Thrombate III | Людський антитромбін III | Порошок для ін'єкції | Дефіцит антитромбіну, профілактика тромбоемболії | Grifols |
| Beriner | Інгібітор естерази C1 | Порошок для ін'єкції | Напади спадкового ангіоневротичного набряку | CSL Behring |
| Cinryze | Інгібітор естерази C1 | Порошок для ін'єкції | Профілактика спадкового ангіоневротичного набряку | Takeda |
| Koate-DVI | Людський фактор згортання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (дефіцит фактора VIII) | Grifols |
| Hemofil M | Людський фактор згортання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Takeda (Baxter) |
| Monoclate P | Людський фактор згортання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | CSL Behring |
| Alphanate | Людський фактор згортання VIII/фактор фон Віллебранда | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А, хвороба фон Віллебранда | Grifols |
| Humate-P | Людський фактор згортання VIII/фактор фон Віллебранда | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А, хвороба фон Віллебранда | CSL Behring |
| Wilate | Людський фактор згортання VIII/фактор фон Віллебранда | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А, хвороба фон Віллебранда | Octapharma |
| AlphaNine SD | Людський фактор згортання IX | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В (дефіцит фактора IX) | Grifols |
| Mononine | Людський фактор згортання IX | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В | CSL Behring |
| Profilnine | Людський фактор згортання IX | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В | Grifols |

| | | | | |
|----------------------|---|----------------------|---|-----------------|
| | згорання IX | | | |
| <i>Corifact</i> | Людський фактор згорання XIII | Порошок для ін'єкції | Дефіцит фактора XIII | CSL Behring |
| <i>Fibrogammin P</i> | Людський фактор згорання крові XIII | Порошок для ін'єкції | Дефіцит фактора XIII | CSL Behring |
| Riastap | Людський фібриноген | Порошок для ін'єкції | Вроджений дефіцит фібриногену, кровотеча | CSL Behring |
| Fibryga | Людський фібриноген | Порошок для ін'єкції | Дефіцит фібриногену | Octapharma |
| Kcentra | Людський протромбіновий комплекс (фактори II, VII, IX, X) | Порошок для ін'єкції | Реверсія варфарину, невідкладна кровотеча | CSL Behring |
| Feiba | Антиінгібіторний коагуляційний комплекс | Порошок для ін'єкції | Гемфілія з інгібіторами | Takeda |
| Thrombate III | Людський антитромбін III | Порошок для ін'єкції | Дефіцит антитромбіну | Grifols |
| Beriate | Людський фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемофілія А | CSL Behring |
| Haemate P | Людський фактор згорання VIII/фактор фон Віллебранда | Порошок для ін'єкції | Гемофілія А, хвороба фон Віллебранда | CSL Behring |
| Рекомбінантні | | | | |
| Advate | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (профілактика, лікування кровотеч) | Takeda |
| Recombinate | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Takeda (Baxter) |
| Kogenate FS | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Bayer |
| Helixate FS | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | CSL Behring |
| Xyntha | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Pfizer |
| Novoeight | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Novo Nordisk |
| Nuwiq | Рекомбінантний фактор згорання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Octapharma |

| | | | | |
|------------|--|----------------------|---|------------------|
| | згортання VIII | | | |
| Kovaltry | Рекомбінантний фактор згортання VIII | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А | Bayer |
| Adynovate | Рекомбінантний фактор згортання VIII (PEG-ований) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (подовжений період напіввиведення) | Takeda |
| Afstyla | Рекомбінантний фактор згортання VIII (одноланцюговий) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (подовжений період напіввиведення) | CSL Behring |
| Eloctate | Рекомбінантний фактор згортання VIII (Fc-ф'южн) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (подовжений період напіввиведення) | Sanofi |
| Jivi | Рекомбінантний фактор згортання VIII (PEG-ований) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (подовжений період напіввиведення) | Bayer |
| Esperoct | Рекомбінантний фактор згортання VIII (глікопегільований) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (подовжений період напіввиведення) | Novo Nordisk |
| Altuviiiio | Рекомбінантний фактор згортання VIII (Fc-vWF-XTEN ф'южн) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія А (подовжений період напіввиведення) | Sanofi |
| Obizur | Рекомбінантний фактор згортання VIII (свиняча послідовність) | Порошок для ін'єкції | Набута гемфілія А з інгібіторами | Takeda |
| BeneFIX | Рекомбінантний фактор згортання IX | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В | Pfizer |
| Ixinity | Рекомбінантний фактор згортання IX | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В | Medexus (Aptevo) |
| Rixubis | Рекомбінантний фактор згортання IX | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В | Takeda |
| Alprolix | Рекомбінантний фактор згортання IX (Fc-ф'южн) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В (подовжений період напіввиведення) | Sanofi |
| Idelvion | Рекомбінантний фактор згортання IX (ф'южн з | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В (подовжений період напіввиведення) | CSL Behring |

| | | | | |
|-------------------------------|--|----------------------|--|-----------------------------|
| | альбуміном) | | | |
| Rebinyn | Рекомбінантний фактор згортання IX (глікопегільований) | Порошок для ін'єкції | Гемфілія В (подовжений період напіввиведення) | Novo Nordisk |
| NovoSeven RT | Рекомбінантний фактор згортання VIIa | Порошок для ін'єкції | Гемфілія з інгібіторами, тромбастенія Гланцмана | Novo Nordisk |
| <i>Tretten / NovoThirteen</i> | Рекомбінантний фактор згортання XIII A-субодиниця | Порошок для ін'єкції | Дефіцит фактора XIII A-субодиниці | Novo Nordisk |
| Vonvendi | Рекомбінантний фактор фон Віллебранда | Порошок для ін'єкції | Хвороба фон Віллебранда | Takeda |
| Andexxa | Рекомбінантний фактор згортання Ха (інактивований) | Порошок для ін'єкції | Реверсія інгібіторів фактора Ха (наприклад, ривароксабан) | AstraZeneca (Portola) |
| Ruconest | Рекомбінантний інгібітор естерази C1 | Порошок для ін'єкції | Напади спадкового ангіоневротичного набряку | Pharming |
| Atryn | Рекомбінантний антитромбін | Порошок для ін'єкції | Дефіцит антитромбіну (профілактика під час хірургії/перипартальний період) | LEO Pharma (rEVO Biologics) |

На рис. 1.2 наведено технологічні процеси, що використовуються для створення препаратів для гемофілії: плазмових похідних, рекомбінантних продуктів та генних терапій.

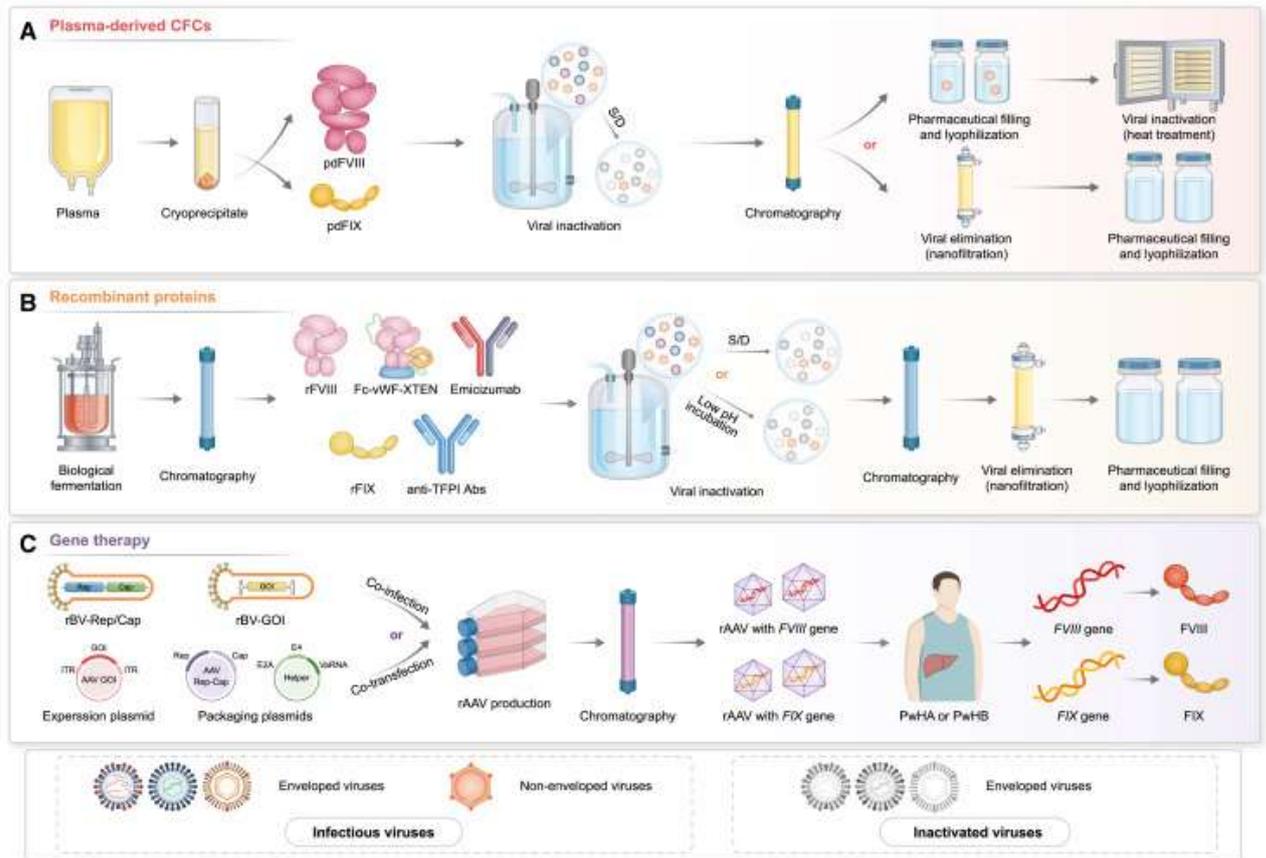


Рис. 1.2 – Виробництво препаратів для лікування гемофілії: (А) Виробництво плазмових факторів, (В) Виробництво рекомбінантних факторів та моноклональних антитіл, (С) Генна терапія (Ілюстрація взята з [16])

Виробництво плазмових факторів (рис. 1.2) зображає традиційний процес отримання факторів згортання з плазми крові здорових донорів. Сировиною є здорова людська плазма, з якої виділяють та очищують фактори. Процес включає багатоступеневе очищення: центрифугування, преципітацію, хроматографію (афінну, іонообмінну) та вірусну інактивацію та елімінацію. Кінцевий продукт – ліофілізовані концентрати середньої або ультрависокої чистоти [8, 9, 11, 58]. Виробництво рекомбінантних факторів та моноклональних антитіл зображає біосинтез рекомбінантних факторів (на прикладах rFVIII та rFIX) та моноклональних антитіл (Abs) за допомогою

рекомбінантної ДНК-технології. Процес починається з експресії в клітинних лініях, ферментації, багатоступеневої хроматографії, вірусної інактивації та отримання готової форми. У виробництві генотерапевтичних препаратів описується введення нуклеїнових кислот в соматичні клітини пацієнтів для корекції мутацій. Використовуються рекомбінантні адено-асоційовані віруси (rAAV) з компонентами: капсидними генами (Cap), цільовий геном (GOI – FVIII або FIX), інвертованими термінальними повторами (ITR), реплікаційними генами (Rep). Альтернатива – рекомбінантний бакуловірус (rBV). Процес включає культивування в клітинах, очищення та пакування для внутрішньовенної доставки [16].

На основі Державного реєстру лікарських засобів [3] серед препаратів, представлених у табл. 1.1, в Україні наявні наступні:

плазмові

- Emoklot (людський фактор згортання VIII, порошок для ін'єкції, гемофілія А) - Виробник: Kedrion
- Людський фактор згортання VIII (плазмовий) (генеричний, наприклад, 1000 МО, порошок, гемофілія А) - Grifols
- Людський фактор згортання IX (плазмовий) (генеричний, наприклад, 500 МО, порошок, гемофілія В) - Grifols
- Людський фактор згортання VIII та фактор фон Віллебранда (генеричний, наприклад, 1000 МО, порошок, гемофілія А/хвороба фон Віллебранда) - Behring
- Veriate (людський фактор згортання VIII, порошок, гемофілія А) - CSL Behring
- Haemate P (людський фактор згортання VIII/фактор фон Віллебранда, порошок, гемофілія А/хвороба фон Віллебранда) - CSL Behring
- Humate-P (людський фактор згортання VIII/фактор фон Віллебранда, порошок, гемофілія А/хвороба фон Віллебранда) - CSL Behring
- Monopine (людський фактор згортання IX, порошок, гемофілія В) - CSL Behring

рекомбінантні

- Людський фактор згортання VIII (рекомбінантний) (генеричний, наприклад, 250 МО, порошок, гемофілія А) - Bayer
- Esperoct (рекомбінантний фактор згортання VIII глікопегільований, порошок, гемофілія А) - Novo Nordisk
- Helixate (рекомбінантний фактор згортання VIII, порошок, гемофілія А) - CSL Behring
- Idelvion (рекомбінантний фактор згортання IX ф'южн з альбуміном, порошок, гемофілія В) - CSL Behring
- Rixubis (рекомбінантний фактор згортання IX, порошок, гемофілія В) - Takeda
- NovoSeven (рекомбінантний фактор згортання VIIa, порошок, гемофілія з інгібіторами) - Novo Nordisk

Серед українських виробників препаратів крові слід виділити компанію Biopharma, яка виробляє плазмові препарати крові, отримані з донорської плазми, зокрема продукти на основі альбуміну, імуноглобулінів та факторів згортання, які використовуються для замісної терапії, підтримки гемостазу та імунної системи [2].

1. Препарати на основі альбуміну (плазмові кровозамінники)

- Альбувен 10%, 100 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 10%. Активна речовина: людський альбумін. Показання: відновлення та підтримання об'єму циркуляції крові при гіповолемії, шоці, опіках або недостатності об'єму. Коротка характеристика: Колоїдний розчин для внутрішньовенного введення, стабілізує гемодинаміку, безпечний після вірусної інактивації.
- Альбувен 20%, 50 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 20%. Активна речовина: людський альбумін. Показання: відновлення об'єму крові при проявах недостатності, гіпоальбумінемії. Коротка характеристика: Висококонцентрований розчин для швидкого поповнення об'єму, застосовується в критичних станах.

- Альбувен 20%, 100 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 20%. Активна речовина: людський альбумін. Показання: підтримання циркуляції крові при недостатності об'єму. Коротка характеристика: Аналогічний до попереднього, але в більшому об'ємі для тривалої інфузії.

2. Імуноглобуліни (плазмові імунні препарати)

- Біовен 50 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 10%. Активна речовина: людський нормальний імуноглобулін (IgG). Показання: замісна імунотерапія при імунодефіцитах; лікування та профілактика бактеріальних/вірусних інфекцій; імуномодуляція при аутоімунних захворюваннях (наприклад, ІТП, синдром Гійєна-Барре). Коротка характеристика: Високоочищений IgG для внутрішньовенного введення, з широким спектром антитіл.

- Біовен 100 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 10%. Активна речовина: людський нормальний імуноглобулін (IgG). Показання: аналогічні до Біовен 50 мл. Коротка характеристика: Більший об'єм для дозування в дорослих пацієнтів, ефективний у профілактиці інфекцій.

- Біовен Моно 5%, 50 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 5%. Активна речовина: людський нормальний імуноглобулін (IgG). Показання: замісна терапія при первинних і вторинних імунодефіцитах. Коротка характеристика: Нижча концентрація для делікатного введення, фокус на імунодефіцитах.

- Біовен Моно 5%, 100 мл. Лікарська форма: розчин для інфузій 5%. Активна речовина: людський нормальний імуноглобулін (IgG). Показання: аналогічні до Біовен Моно 50 мл. Коротка характеристика: Більший флакон для тривалої терапії, стабілізований для безпечного використання.

- Резоглобін. Лікарська форма: розчин для ін'єкцій. Активна речовина: імуноглобулін анти-D (Rh). Показання: профілактика Rh-імунізації в перед- та післяпологовий період; при викиднях або загрозі викидня. Коротка характеристика: Специфічний імуноглобулін для запобігання гемолітичній хворобі новонароджених у Rh-негативних матерів.

3. Препарати факторів згортання (плазмові коагулянти)

- БіоКлот А 250 МО. Лікарська форма: ліофілізат для розчину для ін'єкцій. Активна речовина: людський фактор згортання VIII. Показання: лікування та профілактика кровотеч при гемфілії А; хвороба фон Віллебранда з дефіцитом фактора VIII. Коротка характеристика: Концентрат фактора VIII для внутрішньовенного введення, з низьким ризиком інгібіторів.

- БіоКлот А 500 МО. Лікарська форма: ліофілізат для розчину для ін'єкцій. Активна речовина: людський фактор згортання VIII. Показання: аналогічні до БіоКлот А 250 МО. Коротка характеристика: Середня доза для помірних кровотеч або профілактики.

- БіоКлот А 1000 МО. Лікарська форма: ліофілізат для розчину для ін'єкцій. Активна речовина: людський фактор згортання VIII. Показання: аналогічні до БіоКлот А 250 МО. Коротка характеристика: Висока доза для важких випадків або хірургічних втручань.

Важливим фактором системи згортання крові є *FXIII*. Вроджений дефіцит FXIII – це важкий розлад згортання крові, що успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Типові геморагічні прояви включають кровотечу з пуповинної кукси в перші дні життя, післяопераційні кровотечі та внутрішньочерепні крововиливи, які при дефіциті FXIII спостерігаються частіше, ніж при інших спадкових коагулопатіях. Крім того, дефіцит FXIII асоціюється з рецидивуючими втратами вагітності та уповільненим загоєнням ран. У більшості випадків вроджений дефіцит зумовлений нестачею субодиниці FXIII-A; частота цієї патології становить приблизно 1 на 2 мільйони, причому 50% молекулярних дефектів, відповідальних за дефіцит субодиниці А, є місенс-мутаціями. Вроджений дефіцит субодиниці FXIII-B зустрічається надзвичайно рідко [23, 30].

Тяжкість геморагічних симптомів є основною причиною проведення регулярної замісної терапії. Профілактика є високоефективною завдяки тривалому періоду напіввиведення FXIII [42]. Довгий час на ринку були доступні лише препарати плазмового походження, включаючи

свіжозаморожену плазму, кріопреципітат та вірусінактивованим концентрат FXIII [63]. Рекombінантний фактор XIII (rFXIII) був розроблений компанією ZymoGenetics Inc. (згодом переданий Novo Nordisk). rFXIII відомий як NovoThirteen в Європі та Tretten в США був схвалений EMA 2012 року, а FDA – 2013 року. Він продукується в системі *Saccharomyces cerevisiae* і не містить продуктів людського або тваринного походження [34, 41, 61, 62, 80, 81].

Фактор XIII стабілізує фібриновий згусток, утворюючи тетрамер A_2B_2 , і його дефіцит призводить до нестабільних тромбів. Рекombінантний фактор XIII (rFXIII), зокрема rFXIII-A2, є ключовим препаратом для лікування вродженого дефіциту фактора XIII А-субодиниці [70].

Серед препаратів у табл. 1.1 до препаратів фактора XIII відносяться плазмові - Corifact, Fibrogammin P та рекombінантні - Tretten, NovoThirteen. Слід відмітити, що в Україні жоден з препаратів факторів крові XIII як плазмові, так і рекombінантні не зареєстровані, що робить аналіз технологій виробництва цього препарату актуальним.

Висновок до розділу 1

Аналіз системи коагуляції крові та препаратів факторів крові демонструє їх фундаментальну роль у підтримці гемостазу, де фактори згортання забезпечують каскадну активацію шляхів (внутрішнього, зовнішнього та спільного), стабілізацію фібринового згустку та регуляцію для запобігання тромбозам чи кровотечам. Порушення цієї системи призводять до серйозних клінічних наслідків, таких як спонтанні геморагії та нестабільні тромби, що підкреслює необхідність замісної терапії.

Препарати крові, плазмові та рекombінантні, значно покращили лікування коагулопатій, зменшивши ризики інфекцій, імуногенність та частоту госпіталізацій на 80-90%. Аналіз ілюструє широкий асортимент препаратів, схвалених FDA та EMA, включаючи альбуміни, імуноглобуліни, фактори згортання від провідних виробників, таких як CSL Behring, Grifols, Takeda, Novo Nordisk. Рекombінантні препарати, з їх високою чистотою,

подовженою дією та відсутністю вірусних ризиків, представляють прогресивний напрямок, хоча високі витрати та можливість утворення інгібіторів призводять до подовження пошуку нових методик та технологій.

В Україні доступні обмежені препарати з таблиці 1.1, переважно плазмові (наприклад, Emoklot, Beriate, Humate-P) та рекомбінантні (наприклад, Esperoct, Idelvion, NovoSeven), але відсутні спеціалізовані засоби для фактора XIII (Corifact, Fibrogammin P, Tretten, NovoThirteen), що ускладнює лікування рідкісних дефіцитів. Український виробник Biopharma пропонує плазмові продукти, які задовольняють базові потреби в замісній терапії, але не охоплюють рекомбінантні.

Таким чином, аналіз виробництва рекомбінантного фактора крові rFXIII є актуальним, оскільки дозволяє оцінити технології для потенційного впровадження в Україні, покращення доступності терапії та зменшення залежності від імпорту.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика об'єктів дослідження

2.1.1 Характеристика та будова FXIII

Фактор XIII (FXIII) є частиною родини ферментів трансглютаміназ (ТГ), які зустрічаються в бактеріях, рослинах і тваринах. Вони належать до суперродини ензимів, які класифікуються як R-глутамініл-пептид:амін γ -глутамілтрансферази (КФ 2.3.2.13). Реакції, що каталізуються родиною ферментів КФ 2.3.2.13, включають трансамідування, деамідування та інкорпорацію амінів. Біологічні функції ТГ охоплюють широкий спектр різноманітних процесів: від участі в заплідненні яйцеклітини, коагуляції сім'яної рідини, загибелі клітин, формування структури епідермісу та волосся до зсідання крові [14, 17].

У людини, окрім FXIII, існують ще вісім інших ТГ. До них належать: кератиноцитарна ТГ (ТГ1), задіяна у формуванні епідермісу; тканинна ТГ (ТГ2) – убіквітарний фермент, що бере участь у різноманітних клітинних функціях, зокрема у клітинній смерті; ТГ3, що відповідає за стабілізацію волосяного фолікула; ТГ4 із нез'ясованою функцією в передміхуровій залозі людини; ТГ5, задіяна в диференціації епідермісу; ТГ6 та ТГ7 із невідомими функціями; білок еритроцитів 4.2, який відіграє роль у підтримці цілісності мембрани еритроцитів (табл. 2.1 за [36]).

Для фактора XIII вказано широкий спектр функцій, пов'язаних не лише з гемостазом, а й з регенерацією тканин та структурною підтримкою матриксу. Генетичні поліморфізми FXIII пов'язані із серцево-судинними захворюваннями, включаючи ішемічну хворобу серця, інсульт та тромбоз глибоких вен. Дефіцит FXIII призводить до сильної кровотечі, порушення загоєння ран та викиднів.

Таблиця 2.1 – Родина трансглутаміназ

| Назва | Локалізація | Тканинний розподіл | Основна(і) функція(ї) |
|--------------------------|---------------------------------|---|--|
| Фактор XIII | Внутрішньо-позаклітинна та | Фракція плазми крові, тромбоцити, моноцити, макрофаги, дендритні клітини, хондроцити, остецити, остеобласти, плацента | Стабілізація згустку; резистентність до фібринолізу; адгезія тромбоцитів до фібрину та стабілізація тромбоцитарно-фібринового згустку; ретракція згустку; стабілізація цитоскелета тромбоцитів; посилення генерації тромбіну на поверхні згустку; міграція клітин у згусток; загоєння ран; адгезія тромбоцитів до ендотеліальних клітин; стабілізація позаклітинного матриксу. |
| ТГ1 (кератиноцитарна ТГ) | Внутрішньоклітинна та мембранна | Кератиноцити, головний мозок | Формування епідермісу. |
| ТГ2 (тканинна ТГ) | Внутрішньо-позаклітинна та | Повсюдний (убіквітарний) | Загибель клітин (апоптоз), безліч інших клітинних функцій. |
| ТГ3 | Внутрішньоклітинна | Багатошаровий плоский епітелій, головний мозок | Стабілізація волосяного фолікула. |
| ТГ4 | Внутрішньоклітинна | Передміхурова залоза (простата) | Формування копулятивної пробки у гризунів; функція у людини нез'ясована. |
| ТГ5 | Внутрішньоклітинна | Переважає (але не виключно) епідерміс | Диференціація епідермісу. |
| ТГ6 | Внутрішньоклітинна | Невідомо | Невідомо. |
| ТГ7 | Внутрішньоклітинна | Невідомо | Невідомо. |
| Білок еритроцитів 4.2 | Внутрішньоклітинна та мембранна | Еритроцити, кістковий мозок, селезінка | Підтримка цілісності мембрани еритроцитів. |

Первинне відкриття білка крові, який забезпечує хімічну стійкість фібрину до розчинення, відбулося у 1940-х роках завдяки працям двох незалежних дослідників. У Сполучених Штатах Роббінс (Robbins), під час роботи над докторською дисертацією в Університеті Іллінойсу, описав

сироватковий фактор, що стабілізує фібрин. Водночас Лоранд (Lorand) зробив аналогічні висновки щодо участі специфічного білка у формуванні фібрину, встановивши, що цей чинник походить із плазми, а не із сироватки крові. Протягом тривалого часу цей фактор мав різні назви: фібринстабілізуючий фактор, фактор Лакі-Лоранда, фібринолігаза або фібриназа [73]. На засіданнях Міжнародного товариства з гемостазу та тромбозу у 1950-х та на початку 1960-х років було прийнято рішення використовувати назву фактор XIII (FXIII), виходячи з його ключової функції – стабілізації фібрину – та ієрархічного положення в коагуляційному каскаді [58, 67].

Вперше FXIII був виділений із плазми крові Лорандом (Lorand), а згодом очищений до високого ступеня гомогенності Леві (Loewy) та Шварцом (Schwartz). Дослідники з'ясували, що FXIII складається з двох субодиниць А та двох субодиниць В, які утворюють гетеротетрамерну структуру (A₂B₂) [45, 46, 57]. Перший клінічний випадок дефіциту FXIII, що супроводжувався тяжкими геморагічними проявами, був описаний у Швейцарії в 1960 році Дакертом (Duckert) та співавторами [35]. Надалі Ічіносе (Ichinose) та інші дослідники розшифрували первинні амінокислотні послідовності А- та В-субодиниць, а також структуру гена А-субодиниці [18, 19]. Кристаллографічну структуру димерів FXIII за допомогою рентгеноструктурного аналізу високої роздільної здатності встановили Йі (Yee) та Вайсс (Weiss) та інші вчені [75, 79, 83]. Ці фундаментальні дослідження заклали підґрунтя для глибокого розуміння біології, просторової організації та функціональних властивостей цього фактора згортання крові.

Плазмовий FXIII (nFXIII) циркулює в крові у вигляді гетеротетрамеру, позначеного як FXIII-A₂B₂, який складається з двох каталітичних субодиниць А та двох носійних (некаталітичних) субодиниць В, що оточують каталітичні субодиниці (рис. 2.1).

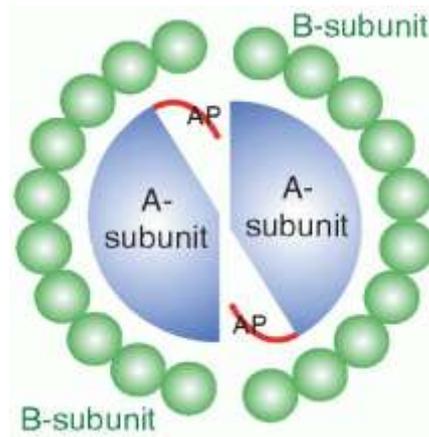


Рис. 2.1. Схематичне представлення тетрамерної структури FXIII A₂B₂: дві молекули FXIII-A (синій колір) розташовані у протилежній орієнтації від N- до С-кінця навколо центральної осі симетрії. Вважається, що гнучкі, ниткоподібні B-субодиниці (зелений колір) обволікають гідрофобні A-субодиниці. Конформація B-субодиниць у цьому представленні є гіпотетичною і базується на попередніх дослідженнях методом електронної мікроскопії. Активаційні пептиди (АП) FXIII зображені червоним кольором (Ілюстрація взята з [36]).

FXIII представляє собою зимоген, що вимагає активації для прояву своєї трансглютаміназної активності. На рис. 2.2 наведено механізми активації FXIII.

Плазмова трансглютаміназа, переважно пов'язана з фібриногеном, що активується тромбіном у присутності кальцію (Ca²⁺) на заключних стадіях каскаду згортання крові, який розглянутий у розділі 1. пFXIII переважно перебуває у нековалентному комплексі з одним зі своїх основних субстратів – фібриногеном. Тромбін розщеплює пептидний зв'язок між Arg37 та Gly38 в активаційному пептиді (АП-FXIII, activation peptide (AP-FXIII)), розташованому біля амінотермінального кінця субодиниць A₂, що призводить до дестабілізації комплексу (рис. 2.2, А). Подальше приєднання іонів Ca²⁺ сприяє дисоціації інгібіторних субодиниць FXIII-B₂, вивільняючи активний фермент трансглютамінази – FXIII-A₂. Фібрин функціонує як кофактор активації FXIII, утворюючи потрійний комплекс з тромбіном та FXIII, що

прискорює процес протеолізу. Після активації FXIII (FXIIIa) проявляє трансамідазну активність, вводячи ϵ -(γ -глутаміл)лізильні ізопептидні поперечні зв'язки в білкові субстрати. Такі зв'язки можуть формуватися як всередині одного субстрату (наприклад, фібрину), так і між різними білками, що може впливати на їхню біологічну активність [17, 36].

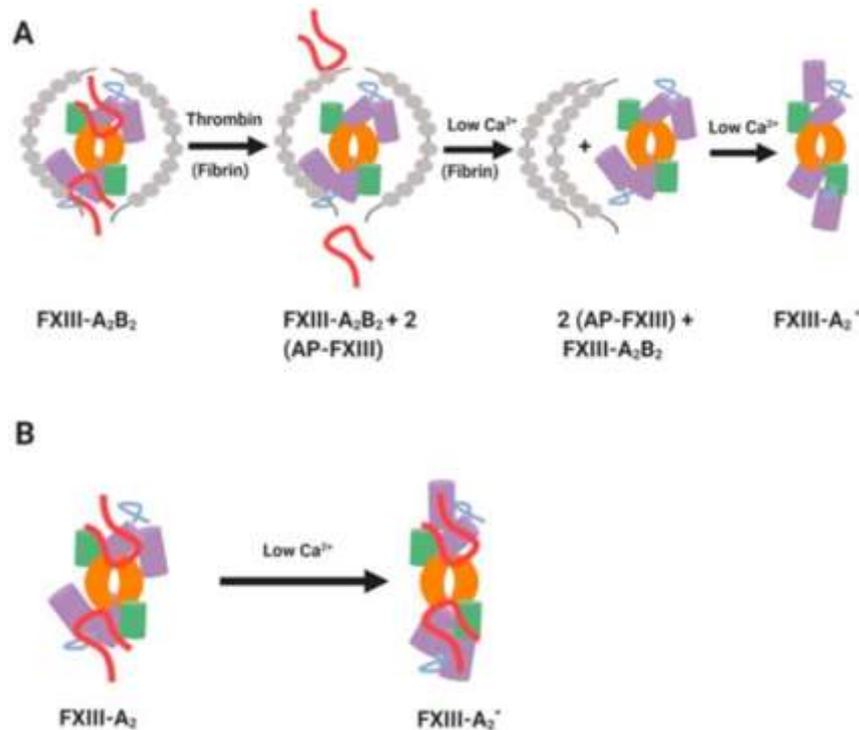


Рис. 2.2. Механізми активації FXIII:

(А) Тромбін- та Ca^{2+} -залежне розщеплення FXIII-A₂B₂; (В) Непротеолітична активація клітинного FXIII-A під дією низьких концентрацій Ca^{2+} . Зелені та фіолетові циліндри представляють β -сендвіч та β -барель домени субодиниці FXIII-A відповідно. Центральні домени субодиниці FXIII-A показані помаранчевим, а активаційні пептиди – червоним. Інгібіторні субодиниці В показані сірим кольором (Ілюстрація та пояснення до неї взяті з [17])

Клітинна форма FXIII є гомодимером субодиниць А (FXIII-A). Клітинний FXIII-A активується непротеолітичним шляхом при помірному підвищенні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} (рис. 2.2, В). FXIII-A міститься в клітинах кістковомозкового та мезенхімального походження, зокрема в тромбоцитах, мегакаріюцитах, моноцитах, циркулюючих та

тканинних макрофагах, дендритних клітинах, хондроцитах, остеобластах та преадипоцитах [17].

Субодиниця А FXIII (FXIII-A) є ключовим каталітичним компонентом фактора XIII; складається з 732 амінокислот з молекулярною масою 83 кДа [65]. Молекулярна структура FXIII-A має таку будову, щоб утримувати фермент в інертному стані до моменту необхідності та забезпечувати точність реакції трансглютамінації.

FXIII-A складається з кількох доменів: активаційний пептид (AP-FXIII, залишки 1–37); β -сендвіч домен (38–184); каталітичний центральний (core) домен (185–515); домен β -барель-1 (516–628); домен β -барель-2 (629–731) (рис. 2.3) [17].

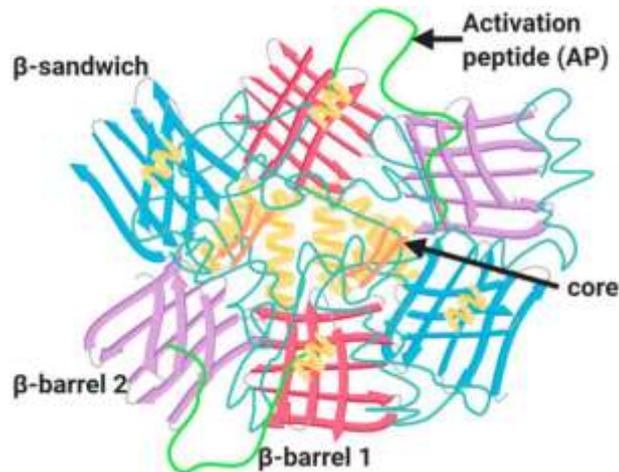


Рис. 2.3. Структура субодиниці А FXIII: помаранчевий - каталітичний центральни домен, синій - β -сендвіч домен, червоний - домен β -барель-1, фіолетовий - домен β -барель-2; блідо-жовтий - α -спіралей, зелений - активаційний пептид (AP) (Ілюстрація взята з [17])

Активаційний пептид (AP-FXIII, залишки 1–37) є «запобіжником» ферменту. Являє собою гнучкий N-термінальний сегмент. В зимогенній (неактивній) формі цей пептид фізично закриває доступ до активного центру (Cys314). Він утримує молекулу в закритому стані, запобігаючи випадковому зсіданню крові. Під дією тромбіну зв'язок Arg37-Gly38 розривається, пептид від'єднується, що дозволяє молекулі «розкритися» для подальшої активації.

β -сендвіч домен (залишки 38–184) складається з антипаралельних β складок, що нагадують сендвіч. Цей домен відіграє роль структурного фундаменту та бере участь у стабілізації димеру A2. Він допомагає правильно орієнтувати активаційний пептид відносно каталітичного ядра.

Каталітичний центральний домен (залишки 185–515) містить велику кількість α -спіралей та включає каталітичну тріаду (Cys314, His373, Asp396). Тут формується ковалентний зв'язок між молекулами фібрину. Містить специфічний сайт для іонів кальцію, які необхідні для зміни конформації білка після відщеплення активаційного пептиду. Без кальцію активний центр залишається недоступним навіть після дії тромбіну.

Домен β -барель-1 (залишки 516–628) та домен β -барель-2 (залишки 629–731) розташовані на С-термінальному кінці молекули. Вони обмежують рухливість каталітичного домену в неактивному стані. Ці домени критично важливі для формування гетеротетрамера A_2B_2 у плазмі. Вони забезпечують контактну поверхню для взаємодії з транспортними субодинамиціями В, які захищають субодинамицю А від деградації в кровотоці [17].

Загалом структура працює як динамічний замок: замок закритий – активаційний пептид та β -барелі блокують ядро; ключ 1 (тромбін) – відрізає активаційний пептид; ключ 2 (кальцій) – розсуває β -барелі та змінює положення залишків каталітичної тріади, роблячи Cys314 доступним для фібрину.

Каталітичний центральний домен переважно складається з α спіралей; проте решта доменів містять β -складчасті структури з обмеженою кількістю спіральних елементів. Каталітичні центри двох субодинамиць FXIII-A вирівнюються, утворюючи димер FXIII-A2, який оточений шістьма доменами з β -структур. Залишок цистеїну в активному центрі (Cys314) повністю закритий активаційним пептидом (AP-FXIII), що перешкоджає взаємодії з цільовими субстратами. Дисоціація AP-FXIII сприяє структурній перебудові каталітичної тріади (Cys314; His373; Asp396), що відкриває доступ субстрату до активного центру. Також у кожній субодинамиці FXIII-A є один сайт

зв'язування Ca^{2+} , необхідний для активації трансглютамінази [17].

Для перехресного зв'язування білків FXIIIa використовує механізм подвійного заміщення. На першому етапі Cys314 атакує γ -карбоксамідну групу глутаміну в білку-акцепторі глутаміну, витісняючи молекулу аміаку з утворенням тіоефірного проміжного продукту. На другому етапі реактивний тіоефірний проміжний продукт атакується ϵ -аміногрупою лізину в білку-донорі аміну, що витісняє Cys314 і призводить до утворення ізопептидного зв'язку між двома субстратними білками з одночасним вивільненням FXIIIa. За відсутності залишків лізину вода реагує з тіоефірним проміжним продуктом, перетворюючи глутамін на глутамінову кислоту [17].

Субодинця В FXIII (FXIII-B) - лікопротеїн, що складається з 641 амінокислоти та містить 8,5% вуглеводів; його молекулярна маса становить 80 кДа. Він є типовим мозаїчним білком, що складається з 10 коротких тандемних повторів, які називаються Sushi-доменами (суші-домени) або структурами GP-I. Кожен такий домен містить 60 амінокислот і стабілізується парою внутрішніх дисульфідних зв'язків. Sushi-домени зазвичай беруть участь у білок-білкових взаємодіях. Білок FXIII-B повністю складається з 10 Sushi-доменів, має 20-амінокислотну лідерну послідовність для секреції та коротку 11-амінокислотну С-кінцеву послідовність. Кожен Sushi-домен містить чотири залишки цистеїну, які утворюють два дисульфідні зв'язки, що забезпечують стабільність структури домену. Таким чином, загалом у FXIII-B налічується 20 дисульфідних зв'язків [40].

Третинна структура FXIII-B при візуалізації методом електронної мікроскопії (ЕМ) FXIII-B виглядає як довга нитка або «намистини на нитці» (рис. 2.4) [28]. Дослідження з використанням рекомбінантного FXIII-B та його вкорочених фрагментів дозволили припустити, що перший Sushi-домен відповідає за зв'язування з FXIII-A, а четвертий та дев'ятий Sushi-домени забезпечують взаємодію з іншою В-субодинцею [74].

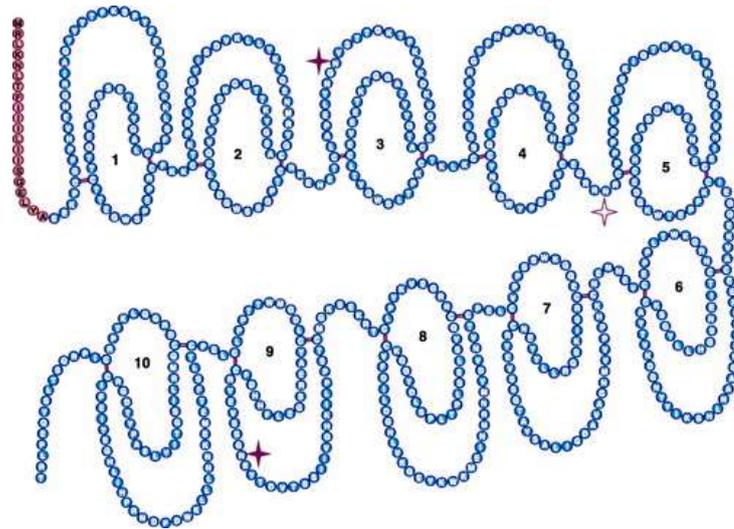


Рис. 2.4. Схематична структура FXIII-B, що складається з 10 Sushi-доменів, кожен з яких скріплений двома парами дисульфідних зв'язків. Амінокислоти лідерної послідовності зображені фіолетовим кольором, а амінокислоти зрілого білка – блакитним. Зафарбовані зірочки вказують на сайти N-глікозилювання, а порожня зірочка позначає потенційний сайт глікозилювання, до якого не приєднано жодного вуглеводного ланцюга (Ілюстрація та пояснення взяті з [40]).

В-субодиниця (FXIII-B) відіграє багатогранну роль у функціонуванні фактора XIII, забезпечуючи його стабільність, регуляцію активації та субстратну специфічність. Шляхом зв'язування двох В-субодиниць із димером А-субодиниць формується гетеротетрамерний комплекс (A_2B_2), що забезпечує термодинамічну стабільність протрансглютамінази в умовах циркуляції у плазмі крові. Дисоціація В-субодиниць від каталітичного димеру А є облігатним етапом перетворення неактивного FXIII на функціонально активну форму FXIIIa. Крім цього, FXIII-B виступає медіатором взаємодії фактора з γ -ланцюгом фібриногену, що дозволяє точно локалізувати трансамідуючу активність ферменту безпосередньо на його головному субстраті під час формування фібринової сітки [36].

2.1.2 Генетична характеристика та екзон-інтронна організація

FXIII

Ген, що кодує А-субодиницю фактора XIII людини (F13A1), має довжину понад 160 т.п.н. (тисяч пар нуклеотидів) і локалізований у хромосомному регіоні 6p24–25. У результаті транскрипції утворюється мРНК розміром 3,9 т.н., яка містить 5'-нетрансльовану ділянку (84 п.н.), відкриту рамку зчитування (2,2 т.п.н.) та 3'-нетрансльовану ділянку (1,6 т.п.н.). Структура гена F13A1 включає 15 екзонів та 14 інтронів. Функціональний розподіл екзонів наступний: екзон I містить 5'-некодуєчу ділянку; екзон II кодує активаційний пептид (AP-FXIII); екзони II–IV детермінують структуру β -сандвіч-домену; екзони IV–XII кодують домен каталітичного ядра; екзони XII–XV відповідають за формування двох β -барель доменів (зокрема, екзони XII–XIII для першого та XIII–XV для другого) (рис. 2.5) [18, 40].

На рис. 2.5 наведено структури гена F13A1 та відповідних доменів білка FXIII-A. Рисунок демонструє лінійну послідовність 15 екзонів (позначених цифрами від 1 до 15), які кодують специфічні функціональні частини білка [40]:

Екзон 1 (5' UTR region). Нетрансльована ділянка, що не кодує амінокислоти, але важлива для регуляції трансляції.

Екзон 2 (Activation peptide). Кодує активаційний пептид (AP-FXIII). Саме тут знаходиться сайт розщеплення тромбіном, що перетворює профермент на активну форму.

Екзони 2–4 (β -sandwich). Кодують β -сандвіч-домен (жовтий колір).

Екзони 4–12 (Core 1). Кодують каталітичне ядро (зелений колір). Це центральна частина ферменту, де розташований активний центр (Cys314).

Екзони 12–15 (β -barrel 1 та 2). Кодують два бочкоподібні домени (синій та червоний кольори), що стабілізують структуру та беруть участь у взаємодіях.

Екзон 15 (3' UTR region). Кінцева нетрансльована ділянка.

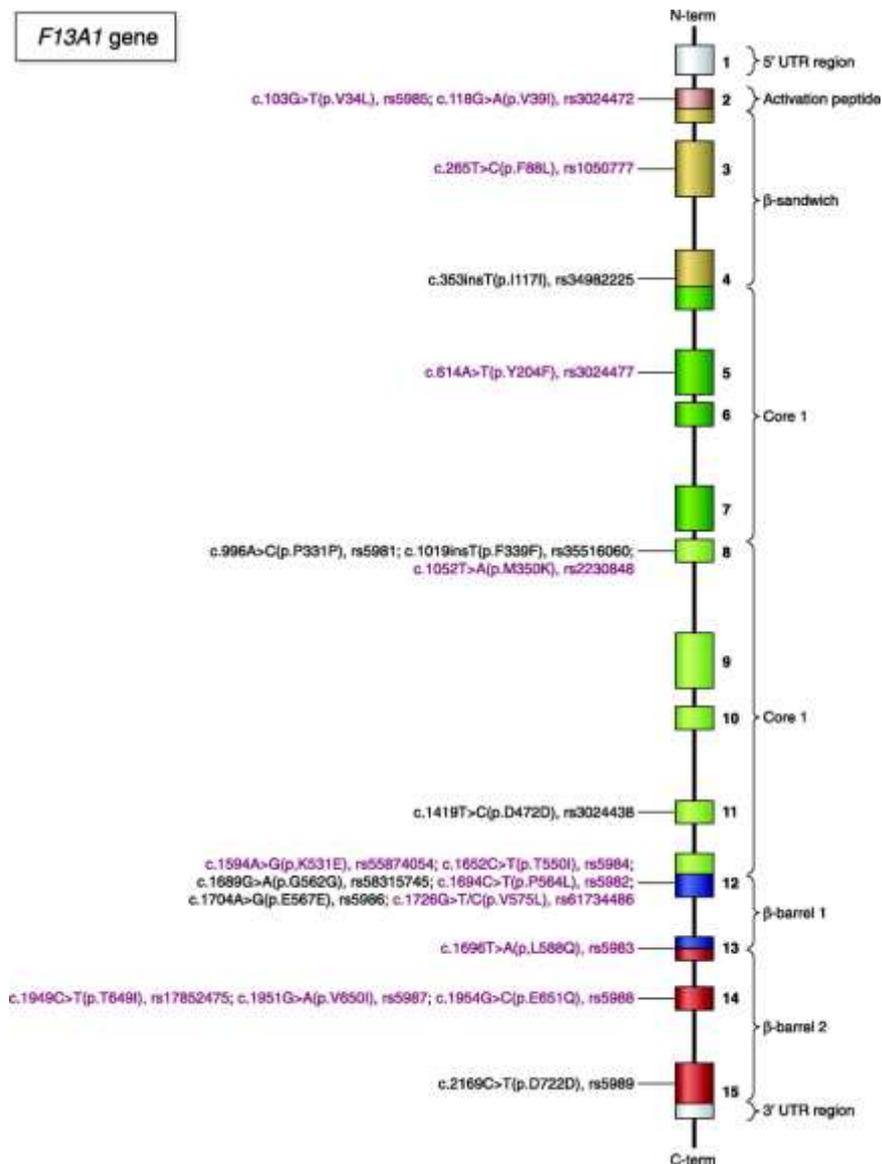


Рис. 2.5. Структура гена F13A1 та відповідних доменів білка FXIII-A, на якій нанесено відомі одонуклеотидні поліморфізми (Ілюстрація та її опис взяті з [40])

На рис. 2.5 у структурі гена F13A1 нанесено відомі на сьогодні одонуклеотидні поліморфізми – стабільна генетична варіація, при якій певна послідовність ДНК у гені відрізняється у різних людей. Текст біля екзонів позначає конкретні генетичні варіанти: фіолетовий колір позначає місенс-мутації (наприклад, p.V34L), це заміни, які призводять до заміни однієї амінокислоти на іншу в білку, що може змінити його функції; чорний колір позначає мовчазні мутації (наприклад, p.I117I), де нуклеотид змінюється, але

амінокислота залишається тією самою, такі зміни зазвичай не впливають на структуру білка безпосередньо. Наприклад, місенс-мутація с.103G>T(p.V34L), rs5985 означає: с.103G>T – у 103-й позиції кодуючої ДНК гуанін замінено на тимін; p.V34L – це призвело до заміни валіну (V) на лейцин (L) у 34-й позиції білка; rs5985 – міжнародний ідентифікатор цього поліморфізму в базі даних dbSNP [31].

Найчастіше йдеться про однонуклеотидні поліморфізми – це «друкарські помилки» в генетичному коді, де лише один нуклеотид замінюється на інший. Поліморфізми, наприклад Val34Leu, розглядаються як ключовий чинник, що визначає «поведінку» системи згортання крові [78]. Вивчення поліморфізмів гена F13A1 має фундаментальне значення для розуміння індивідуальної варіабельності гемостазу. Вони виступають генетичними детермінантами, що визначають кінетику ферментативних реакцій та структурно-механічні властивості фібринових згустків, що має пряме клінічне значення, зокрема при оцінці ризику серцево-судинних захворювань [43, 44].

Серед численних однонуклеотидних поліморфізмів кодуючої ділянки гена F13A1 найбільш клінічно значущим є поліморфізм Val34Leu, що знаходиться на екзоні 2. Ця зміна розташована дуже близько до місця активації тромбіном. Це прискорює відщеплення активаційного пептиду, що робить процес згортання крові та стабілізації фібрину ефективнішим у певних умовах. Дана мутація, характерна переважно для європеїдної популяції, зумовлює прискорену активацію FXIII тромбіном. Вплив цього поліморфізму на структуру фібринового згустку має складний характер і модулюється концентрацією фібриногену: у носіїв алеля Leu34 при високому рівні фібриногену формується пухка мережа з товстими волокнами та високою проникністю, що забезпечує захисний ефект проти венозного тромбоемболізму та інфаркту міокарда [43, 44].

Домени β -barrel 1 та 2 (екзони 12–15) мають багато поліморфізмів, вони менш консервативні, ніж каталітичне ядро. Однак мутації в ядрі (екзони 4-12)

частіше призводять до патологій, таких як важкий дефіцит фактора XIII [40].

Експресія FXIII-A притаманна переважно клітинам мієлоїдного ряду. Найвищі концентрації білка спостерігаються в тромбоцитах, де його вміст становить близько 3% від загальної маси клітинних білків, що у 100–150 разів перевищує рівень у плазмі крові. У тромбоцитах, як і в їхніх попередниках мегакаріоцитах, FXIII-A локалізований виключно в цитоплазмі. Окрім тромбоцитарної ланки, фактор синтезується моноцитами та різними популяціями тканинних макрофагів (зокрема альвеолярними макрофагами, дермальними дендроцитами та макрофагами плаценти). Важливо зазначити, що у моноцитах та тромбоцитах відсутня В-субодиниця, тому клітинний FXIII представлений виключно гомодимером A₂ [40].

Субодиниця А FXIII-A експресується у всіх досліджених хребетних. На сьогодні *рекомбінантний FXIII-A₂ (rFXIII)* експресований у бактеріальних та дріжджових системах *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosacharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, а також у клітинах та цілих рослинах тютюну [26, 27, 39, 47, 51, 71].

Ген, що кодує В-субодиницю фактора XIII (F13B), локалізований на довгому плечі 1-ї хромосоми (ділянка 1q31–32.1). Його протяжність становить приблизно 28 т.п.н., а структура включає 12 екзонів та 11 інтронів. У результаті транскрипції формується мРНК розміром 2,2 т.н., що транслюється у зрілий білок із 641 амінокислотного залишку. Ген F13B входить до складу кластера гомологічних генів на хромосомі 1, що кодують білки-регулятори системи комплементу (фактор Н, С4-зв'язувальний білок та інші). Спільною ознакою цих білків є наявність коротких консенсусних повторів, відомих як Sushi-домени [19, 40].

На рис. 2.6 наведено структуру гена FXIII-B, що має наступну організацію:

Екзон I кодує сигнальну послідовність із 20 амінокислот, що забезпечує секрецію білка за класичним шляхом;

Екзони II–XI – кожен із цих екзонів окремо кодує один із 10 Sushi-

доменів. Висока гомологія між доменами свідчить про їх виникнення шляхом дуплікації генів та екзонного шафлінгу в процесі еволюції;

Екзон XII відповідає за COOH-термінальну ділянку білка та 3'-нетрансльовану область.

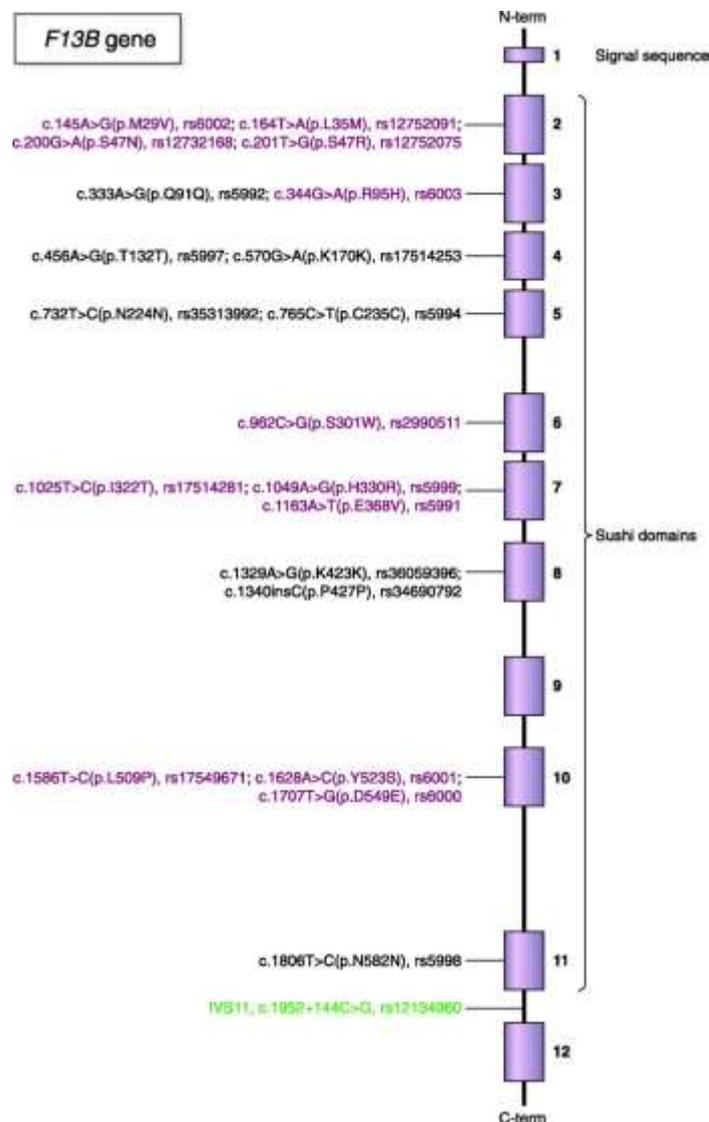


Рис. 2.6. Структура гена *F13B* та відповідних доменів білка FXIII-B, на якій нанесено відомі одонуклеотидні поліморфізми (Ілюстрація та її опис взяті з [40])

За рис. 2.6 фіолетовим текстом позначені місенс-мутації, що змінюють амінокислотний склад білка (наприклад, p.M29V, p.R95H, p.S301W); чорним текстом позначені синонімічні мутації (наприклад, p.Q91Q, p.C235C); зеленим вказаний інтронний поліморфізм (IVS11, c.1952+144C>G), який впливає на

сплайсинг і змінює довжину білка. Поліморфізми рівномірно розподілені по всьому гену, охоплюючи майже всі Sushi-домени, що підкреслює високий ступінь генетичної варіабельності FXIII-B.

Поліморфна природа FXIII-B була описана давно; історично виділяли три основні фенотипи, асоційовані з певними популяціями: FXIII-B*1 (європейська), FXIII-B*2 (африканська) та FXIII-B*3 (азійська) [25, 56]. Серед ключових поліморфізмів виділяють His95Arg (rs6003) та IVS11+144 (rs12134960). Так, при rs6003 заміна аденіну на гуанін в екзоні III призводить до заміни гістидину на аргінін у другому Sushi-доміні. Цей варіант (асоційований з фенотипом FXIII-B*2) зустрічається у близько 15% європеїдів і значно частіше серед африканців, але відсутній у азійців. У плазмі носіїв алеля Arg спостерігалася прискорена дисоціація субодиниць FXIII [20, 33]. При rs12134960 мутація в інтроні K створює новий сайт акцептора сплайсингу. Це призводить до синтезу білка, який на 15 амінокислот довший на COOH-кінці. Даний варіант характерний для азійських популяцій (фенотип FXIII-B*3) [33, 60]

FXIII-B експресується переважно в печінці під контролем транскрипційних факторів HNF1 α та HNF4 α [40].

2.2 Характеристика методів дослідження

Для досягнення поставленої мети та розв'язання завдань кваліфікаційної роботи було застосовано комплексний підхід, що включає аналіз сучасних наукових публікацій стосовно біотехнологічних методів виробництва рекомбінантного фактора XIII (rFXIII). Основним методом дослідження став системний аналіз наукової літератури у міжнародних наукометричних базах (PubMed, Scopus, Web of Science), сайтів регуляторних органів Food and Drug administration, European Medicine Agence, Державний реєстр лікарських засобів, сайтів компаній виробників препаратів факторів крові.

Висновок до розділу 2

FXIII є унікальним представником родини трансглютаміназ людини, що існує в двох формах: плазмовій (гетеротетрамер A_2B_2) та клітинній (гомодимер A_2). Субодиниця А (FXIII-А, 83 кДа, 732 амінокислоти) містить каталітичну тріаду Cys314–His373–Asp396, активаційний пептид (1–37), β -сендвіч-домен, центральний каталітичний домен та два β -барель домени. Вона не глікозильована, містить два інтрамолекулярні дисульфідні зв'язки на мономер і вимагає активації тромбіном та Ca^{2+} для перетворення на активну трансглютаміназу FXIIIa, яка формує ϵ -(γ -глутаміл)-лізильні ізопептидні зв'язки. Субодиниця В (FXIII-В, 80 кДа, 641 амінокислота) – глікопротеїн, що складається з 10 Sushi-доменив, виконує роль інгібіторної та стабілізуючої субодиниці, забезпечує циркуляційну стабільність і специфічність взаємодії з фібриногеном. Ген F13A1 (6p24–25, 160 т.п.н., 15 екзонів) кодує субодиницю А, ген F13B (1q31–32.1, 28 т.п.н., 12 екзонів) – субодиницю В.

Об'єкт дослідження характеризується високою структурною складністю, відсутністю глікозилювання в каталітичній субодиниці А, необхідністю правильного димеризації та фолдингу, що робить вибір системи експресії критичним для збереження біологічної активності.

Для вирішення завдань роботи застосовано системний аналіз наукової літератури з баз PubMed, Scopus, Web of Science, офіційних джерел FDA, EMA, Державного реєстру лікарських засобів України та сайтів виробників, що дозволило зібрати, узагальнити та критично оцінити дані щодо структури, генетики, механізмів активації FXIII та існуючих технологій виробництва рекомбінантного rFXIII.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Обґрунтування системи експресії для виробництва rFXIII

Вибір оптимальної системи експресії для синтезу біологічних препаратів на основі рекомбінантних білків зумовлений двома ключовими аспектами: здатністю системи до коректного фолдингу і посттрансляційної модифікації цільового білка, а також економічною ефективністю та масштабованістю процесу в умовах промислового виробництва [64].

Подолання труднощів у виробництві білків починається з розуміння спектру внутрішніх властивостей – згортання, посттрансляційні модифікації, збірку мультисубодиничних комплексів, розчинність та токсичність [6]. Масштабування є ще одним важливим критерієм при виборі платформи для експресії білків. Промислове виробництва вимагають високих виходів чистих білків за розумною ціною, що потребує систем, здатних до розширення виробництва без шкоди для якості продукту та стабільності врожаю. Можливість безперешкодного переходу від лабораторного масштабу до великомасштабного виробництва гарантує, що перспективні білки можуть ефективно просуватися від ідеї до комерціалізації [12, 64].

Як правило, першочерговим вибором для експресії прокаріотичних цільових білків є *Escherichia coli*, хоча залежно від мети використовують і інші бактеріальні системи, наприклад, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Vibrio natriegens* [6, 64]. При виборі системи для виробництва еукаріотичних білків необхідно враховувати комплекс чинників. Для простих еукаріотичних білків, які не потребують посттрансляційних модифікацій (ПТМ) і мають обмежену кількість дисульфідних зв'язків, також можна використовувати *E. coli*. Проте в багатьох процесах доцільніше використовують еукаріотичні системи, такі як дріжджі, клітини комах або ссавців.

Однією з основних відмінностей між цими еукаріотичними

платформами є тип глікозилювання (N- та O-глікозилювання), який вони забезпечують. Клітини ссавців продукують переважно N-глікани складного типу, в яких молекули модифіковані N-ацетилглюкозаміном, галактозою, фукозою та сіаловою кислотою. N-глікани клітин комах зазвичай не містять кінцевої сіалової кислоти, а модифікуються в пауциманнозні або олігоманнозні структури. Крім того, наявність залишків фукози з $\alpha(1,3)$ -зв'язком, характерних для безхребетних, але відсутніх у ссавців, може спричинити імуногенність. Дріжджі здатні до обох типів глікозилювання, проте їх профіль суттєво відрізняється від клітин ссавців: дріжджове N-глікозилювання належить до гіперманнозного типу, що може зумовлювати антигенність препарату. Якщо тип глікозилювання є критичним для функціонування білка або його подальшого застосування, це стає вирішальним фактором при виборі оптимальної системи [12, 13, 64].

Для мембраноасоційованих або інтегральних мембранних білків вибір системи експресії є принциповим. Хоча синтез невеликих мембранних білків можливий в *E. coli*, для складніших представників цього класу (наприклад, GPCR-рецепторів, іонних каналів та транспортерів) перевага надається еукаріотичним організмам та клітинним лініям, зокрема клітинам комах та ссавців. Варто зауважити, що ліпідне оточення мембран у клітинах комах не ідентичне такому у ссавців. Оскільки клітини комах культивують при 27 °С, склад ліпідів, необхідний для підтримки плинності мембран, відрізняється від ліпідного складу клітин ссавців, які вирощують при 37 °С [13]. Також слід відмітити рослинні системи, які здатні до секреції складних білків та їх спрямування у різні клітинні компартменти, що враховується для синтезу токсичних протеїнів [29, 47].

Експресія рекомбінантних білків в E. coli. *Escherichia coli* є базовою для систем експресії рекомбінантних білків. Її використання у отриманні рекомбінантних білків розпочалося з першого схваленого терапевтичного білка – інсуліну, і до сьогодні *E. coli* залишається найбільш поширеною системою для експресії білків завдяки постійним вдосконаленням штамів, що

використовуються у генній інженерії. Це обумовлено швидким ростом бактерії, з подвоєнням кожні 20 хв, що, у свою чергу, сприяє швидкому та високоврожайному виробництву рекомбінантних білків. Ефективність експресії рекомбінантних білків у системі *E. coli* забезпечується широким арсеналом молекулярно-генетичних інструментів, зокрема оптимізованими векторами та спеціалізованими штамми-господарями. Використання векторів із різними промоторами, афінними тегами та селективними маркерами дозволяє здійснювати прецизійний контроль рівнів біосинтезу, підвищувати розчинність протеїнів та оптимізувати процеси їх очищення [6, 13, 64].

Найбільш розповсюдженим штамом-продуцентом є BL21(DE3), де експресія гена РНК-полімерази фага Т7 знаходиться під контролем промотора lacUV5. Дана конструкція забезпечує високий рівень біосинтезу цільового продукту при індукції IPTG (ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид, індуктор експресії генів) незалежно від фази росту культури. Для розв'язання специфічних задач розроблено ряд похідних цього штаму BL21(DE3): штам pLysS застосовується для зниження базової експресії токсичних білків, а штамми Rosetta та RI(P)L – для компенсації дефіциту рідкісних кодонів при синтезі білків ссавців та стимулювання формування дисульфідних зв'язків [64, 68].

Попри значний технологічний прогрес, використання *E. coli* обмежене неможливістю здійснення складних посттрансляційних модифікацій (ПТМ), зокрема специфічного глікозилювання. Сучасні методики інженерії шляхів глікозилювання в бактеріальних клітинах характеризуються низькою ефективністю та часто потребують додаткових ферментативних маніпуляцій *ex vivo*. Окрім того, при експресії білків із молекулярною масою понад 60 кДа, а також трансмембранних протеїнів ссавців, часто спостерігаються низький вихід цільового продукту, порушення фолдингу та агрегація у вигляді тілець включення. Для подолання цих проблем використовують різноманітні стратегії (гіпотермічне культивування, коекспресія молекулярних шаперонів та використання солубілізуючих тегів), але і вони не забезпечують

універсального вирішення питань коректного згортання та ренатурації протеїнів [6, 12, 13, 26, 54, 64, 68].

Отже, *E. coli* залишається фундаментальною платформою для одержання рекомбінантних білків завдяки високій швидкості росту, економічній доцільності та доступності. Дана система є оптимальною для експресії малих глобулярних одноланцюгових білків, що не потребують складних ПТМ, тому для отримання складних макромолекул використовують альтернативні еукаріотичні системи експресії.

Експресія рекомбінантних білків у дріжджових системах. Дріжджі є ефективними системами-господарями для експресії рекомбінантних білків, оскільки поєднують у собі технологічні переваги прокариотів (швидкість росту, простота генетичних маніпуляцій, низька собівартість поживних середовищ) із властивим еукаріотам складним апаратом біосинтезу. Найбільш поширеними об'єктами для гетерологічної продукції протеїнів є *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia pastoris* (синонім *Komagataella spp.*). Ключовою перевагою дріжджових платформ порівняно з бактеріальними є їхня здатність забезпечувати коректний фолдинг та ПТМ, зокрема глікозилювання та формування дисульфідних зв'язків, що є критичним для функціональної активності складних терапевтичних білків [50].

Історично *S. cerevisiae* широко застосовувалися у промислових біотехнологічних процесах завдяки здатності до великомасштабного культивування та секреції біологічно активних молекул у поживне середовище [32, 37]. Проте останнім часом особлива увага приділяється метилотрофним дріжджам *P. pastoris*, які здатні до досягнення надвисокої щільності біомаси. Висока продуктивність цієї системи зумовлена використанням потужного алкогольоксидазного промотора (AOX1), індукованого метанолом. Наявність альтернативних індукованих та конститутивних промоторів дозволяє оптимізувати біосинтез залежно від структурних особливостей або потенційної токсичності продукту. Дріжджові системи експресії характеризуються високою стабільністю завдяки інтеграції

цільового гена в геном клітини-господаря, що гарантує відтворюваність результатів у різних клонах. Можливість секреції рекомбінантних білків значно спрощує процеси подальшого виділення та очищення, роблячи *P. pastoris* економічно вигідною платформою для комерційного виробництва [50, 71].

Важливим аспектом функціонування дріжджових систем є профіль глікозилювання, який визначає стабільність, період напіввиведення та імуногенність білкових препаратів. *P. pastoris* здійснює як N-, так і O-глікозилювання, проте утворені структури належать до гіперманнозного типу, що відрізняється від гліканів ссавців [71]. На сучасному етапі активно розвиваються методи генетичної інженерії, спрямовані на «гуманізацію» дріжджових штамів шляхом модифікації глікозилтрансфераз для зниження потенційної антигенності терапевтичних протеїнів [6, 12]. Завдяки високій масштабованості та пластичності геному, дріжджові системи залишаються одними з найбільш перспективних інструментів сучасної біотехнології для одержання широкого спектра рекомбінантних продуктів [13, 64].

Експресія рекомбінантних білків у культурах клітин ссавців. Використання клітин ссавців як експресійних платформ має суттєву перевагу завдяки максимальній ідентичності біосинтетичних процесів природним умовам походження цільових білків. Дані системи є оптимальними для одержання структурно коректних протеїнів із прецизійними ПТМ, зокрема секреторних глікопротеїнів, високомолекулярних білків та мультисубодиничних комплексів. Пріоритетність систем ссавців зумовлена можливістю ефективної секреції цільового продукту в поживне середовище, що значно спрощує процеси виділення та очищення завдяки відсутності необхідності лізису клітин та меншій кількості домішок порівняно з клітинними лізатами [13, 64, 72].

Незважаючи на високу трудомісткість та тривалий час розробки, стабільні клітинні лінії забезпечують сталий, передбачуваний та масштабований рівень біосинтезу, що є критичним для промислового

виробництва, наприклад, моноклональних антитіл [6, 12, 64].

Основними клітинними лініями, що застосовуються в сучасній біотехнології, є клітини яєчника китайського хом'яка (СНО) та клітини ембріональної нирки людини (НЕК-293). Лінії СНО є галузевим стандартом у виробництві біологічних препаратів завдяки високій продуктивності, здатності до адаптації в суспензійних культурах та здатності до складного глікозилювання. Лінії НЕК-293 та їхні модифікації (НЕК293F, Expi293F) широко використовуються в дослідженнях через високу ефективність трансфекції та здатність здійснювати модифікації, максимально наближені до природних людських [13, 64, 76].

Попри технологічну досконалість, системи експресії ссавців мають ряд обмежень. Висока собівартість продукції зумовлена специфічними вимогами до поживних середовищ, умов культивування та тривалості виробничих циклів. Крім того, розробка стабільних ліній потребує ретельного скринінгу клонів за параметрами генетичної стабільності та профілями ПТМ для запобігання гетерогенності кінцевого продукту. Порівняно з мікробними системами, вихід рекомбінантного білка в культурах ссавців зазвичай нижчий, а масштабування в біореакторах великого об'єму потребує значних капітальних інвестицій та спеціалізованої інфраструктури [64, 76].

Безклітинні системи експресії рекомбінантних білків (Cell-Free Expression, CFE) – метод біосинтезу *in vitro*, що реалізується поза межами живих клітин. Функціонування системи базується на використанні екзогенного апарату транскрипції та трансляції у розчинному реакційному середовищі. Основними компонентами CFE-системи є генетична матриця (шаблонна ДНК або мРНК), клітинний лізат, що містить рибосомальний апарат, набір есенціальних факторів трансляції, субстрати (амінокислоти та нуклеотиди), а також молекулярні компоненти для регенерації енергії (наприклад, креатинфосфат) [13, 64].

Джерелом для одержання клітинних екстрактів можуть бути прокаріотичні організми (*E. coli*), еукаріотичні системи (ретикулоцити

кролика, зародки пшениці, дріжджі, культури клітин комах або ссавців) та рослинні об'єкти (наприклад, *Nicotiana tabacum*). На відміну від традиційних методів культивування, CFE-системи позбавлені біохімічних обмежень, зумовлених потребами життєдіяльності та проліферації клітин-господарів. Це дозволяє спрямувати весь метаболічний ресурс виключно на синтез цільового продукту, нівелюючи проблеми цитотоксичності та метаболічного навантаження [13, 64].

Гнучкість безклітинних систем дозволяє модифікувати біохімічне оточення шляхом введення нетривіальних добавок, таких як некананічні амінокислоти, ліпосоми, нанодиски, специфічні ліганди та металокофактори. Це створює унікальні можливості для коекспресії цільових протеїнів із шаперонами або партнерами взаємодії, що сприяє отриманню функціонально активних мембранних та токсичних білків [13, 64].

Однак впровадження CFE-технологій пов'язане з певними обмеженнями. Висока вартість реактивів (зокрема нуклеотидтрифосфатів та очищених ферментів) ускладнює масштабування процесів до промислових об'ємів. Крім того, вихід кінцевого продукту часто поступається показникам систем *in vivo*, а стабільність компонентів трансляційного апарату обмежена в часі через термічну деградацію та виснаження енергетичних субстратів. Також існують труднощі з відтворенням складних паттернів посттрансляційних модифікацій, характерних для цілісних еукаріотичних клітин. Незважаючи на зазначені виклики, безклітинні системи залишаються незамінним інструментом для швидкого скринінгу білкових конструктів та синтезу складних об'єктів, експресія яких у живих клітинах є утрудненою або неможливою [13, 64].

Експресія рекомбінантних білків у рослинних системах. Використання рослин як платформ для гетерологічної експресії білків характеризується високою масштабованістю, економічною доцільністю та біологічною безпекою завдяки відсутності спільних із людиною патогенів. Найбільш поширеними модельними об'єктами є *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana*

tabacum, а також сільськогосподарські культури, такі як кукурудза (*Zea mays*) та рис (*Oryza sativa*) [29, 47].

Рослинні системи здатні здійснювати складні ПТМ, зокрема N-глікозилювання, що робить їх придатними для синтезу функціонально активних терапевтичних білків. Важливою перевагою рослин є наявність різноманітних субклітинних компартментів, що дозволяє здійснювати спрямоване націлювання білків. Використання специфічних сигнальних пептидів забезпечує локалізацію рекомбінантних продуктів в ендоплазматичному ретикулумі, вакуолях або хлоропластах, що сприяє коректному фолдингу та захисту протеїнів від ендогенної протеолітичної деградації [29, 47, 64].

Одним із критичних аспектів є відмінність рослинних профілів глікозилювання від ссавців (зокрема, наявність специфічних залишків $\beta(1,2)$ -ксилози та $\alpha(1,3)$ -фукози). Це зумовлює необхідність застосування методів глікоінженерії – створення «гуманізованих» ліній рослин із нокаутуваними генами ендогенних глікозилтрансфераз для зниження потенційної імуногенності білкових препаратів. Попри зазначені переваги, широка комерціалізація рослинних систем стримується низкою чинників: складністю екстракції білків із рослинної біомаси (наявність жорсткої клітинної стінки, фенольних сполук та пігментів), регуляторними обмеженнями щодо вирощування генетично модифікованих організмів у відкритому середовищі, а також варіативністю рівнів експресії трансгенів [13]. Проте розвиток методів синтетичної біології та вдосконалення процесів виділення відкривають нові можливості для використання рослин у виробництві складних протеїнів, синтез яких в інших системах є утрудненим.

Експресія рекомбінантних білків у культурах клітин комах. Клітини комах є універсальними системами-господарями для біосинтезу рекомбінантних білків, що характеризуються високою ефективністю при одержанні складних внутрішньоклітинних та вірусних протеїнів. Це зумовлено здатністю системи до коректного фолдингу макромолекул та

можливістю культивування при високій щільності біомаси. На відміну від прокаріотичних систем, клітини комах мають еукаріотичні шляхи секреції та процесингу (через ендоплазматичний ретикулум та апарат Гольджі), що забезпечує біологічну активність цільових продуктів [6, 13, 64]. Система здатна до широкого спектра ПТМ, зокрема фосфорилування, ацетилювання та пальмітоїлювання. Профіль глікозилювання у комах є більш однорідним порівняно з клітинами ссавців, що спрощує структурний аналіз отриманих білків. Найбільш розповсюдженими клітинними лініями є Sf9, Sf21, Hi-5 та S2 [64].

Основним методом є бакуловірус-опосередкована експресія (BEVS), де цільовий ген інтегрується в геном бакуловірусу (бакмід), який згодом інфікує клітини-господарі. Даний підхід дозволяє експресувати білки з високою молекулярною масою та здійснювати коекспресію кількох субодиниць білкових комплексів (наприклад, за допомогою системи MultiVac). До основних обмежень системи належать висока собівартість поживних середовищ та відмінності у структурі гліканів порівняно з системами ссавців, що може підвищувати імуногенність препаратів [64].

Альтернативним підходом до подолання обмежень традиційних платформ є використання цілих організмів трансгенних комах (зокрема *Drosophila melanogaster*). Дана модель характеризується добре вивченим геномом та наявністю прецизійних інструментів генетичної маніпуляції. Ключовими перевагами використання *D. melanogaster* є: генетичний контроль, масштабованність та ПТМ. Застосування бінарної системи UAS/GAL4 та індукованих промоторів дозволяє здійснювати точний просторово-часовий контроль експресії трансгенів у конкретних тканинах або на певних стадіях розвитку. Технологія базується на розведенні великих популяцій комах, що нівелює залежність від об'ємів біореакторів та знижує операційні витрати. Трансгенні комахи здатні виконувати складні ПТМ, максимально наближені за структурою до модифікацій у ссавців [13, 64].

Незважаючи на перспективність, використання цілих організмів

потребує тривалого часу для створення стабільних ліній та складних процедур екстракції цільового білка з біомаси комах. Проте такий підхід є економічно доцільним для виробництва цитотоксичних білків та продуктів, експресія яких у мікробних системах є неможливою.

Таким чином, кожна система має унікальні характеристики, що визначають її вибір залежно від структури цільового білка та вимог до його чистоти і функціональності (табл. 3.1). Для визначення оптимальної системи експресії для конкретного цільового білка доцільно використовувати схему прийняття рішень, яка базується на відповідях на ключові питання [13]:

1. Який цільовий білок необхідно отримати: прокаріотичний або еукаріотичний?
2. Чи потребує застосування білка посттрансляційних модифікацій (ПТМ)?
 - Чи містить білок дисульфідні зв'язки?
 - Який розмір білка або мультибілкового комплексу?
 - Яка складність інтегрального мембранного білка?
3. Який тип глікозилювання необхідний?
4. Чи потрібен високий вихід продукту / багаторазові цикли експресії?

(рис. 3.1).

Таблиця 3.1 – Характеристика систем експресії для отримання рекомбінантних білків

| Система експресії | Переваги | Недоліки | Приклади штамів | Потенційна можливість використання для субодиниць А та В rFXIII |
|-------------------|--|---|--|---|
| <i>E. coli</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Доступна, проста система - легкість генетичної маніпуляції - Економічна (прості середовища, без дорогих добавок) - Висока врожайність завдяки швидкому росту (20-30 хв) - Ефективна для експресії малих білків - Багато інструментів експресії | <ul style="list-style-type: none"> - Не універсальна для ПТМ (наприклад, глікозилювання) - Низький врожай і проблеми з розчинністю для білків >60 kDa - Накопичення білків у вигляді тілець включень, що вимагає рефолдинга - Проблеми зі згортанням і розчинністю для білків ссавців і трансмембранних білків | <ul style="list-style-type: none"> - Штам BL21(DE3); виробництво інсуліну; модифікація - інтеграція T7 RNA-полімерази під lacUV5 промотором для індукованої експресії IPTG, незалежно від росту бактерій. - Штам Rosetta; виробництво білків ссавців; модифікація - доповнення рідкісними кодонами для покращення трансляції. | <p>Можлива для субодиниці А (використовується для простих білків без складних ПТМ), але обмежена для В через відсутність глікозилювання та правильного згортання; не оптимальна для гетеротетрамеру A2B2, оскільки бракує еукаріотичних модифікацій</p> |
| Дріжджі | <ul style="list-style-type: none"> - Економічна - помірна вартість і швидкий ріст (подвоєння 2-3 год), масштабованість до промислових рівнів. - Високий врожай - Здатність до базових ПТМ (глікозилювання, фосфорилування), ефективний фолдинг і секреція. | <ul style="list-style-type: none"> - Відмінності в глікозилюванні (гіперманозування) - Не підходить для білків, що вимагають людських ПТМ | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 для цитоплазматичної експресії, використовується для rFXIII (Novo Nordisk, вектор pD16 з ADH2-промотором, врожайність 1-2 г/л). - <i>Pichia pastoris</i> (Komagataella phaffii) SMD1168 Метанол-індукований (AOX1-промотор), для секреторних білків, приклад – rFVIII (вихід 5 г/л). - <i>Kluyveromyces lactis</i> GG799 для лактазо-індукованої експресії, низьке глікозилювання; використовується для інтерферонів. | <p>Використовується для субодиниці А (наприклад, rFXIII-A в <i>S. cerevisiae</i> для препарату Tretten); можлива для В, але гіперманозування може впливати на функціональність; підходить для простих еукаріотичних білків.</p> |

| | | | | |
|---------------------|---|--|--|--|
| Клітини ссавців | <ul style="list-style-type: none"> - Легкість ПТМ (глікозилювання, подібне до людського, сіалування) - Правильне згортання білків - Високий врожай у суспензійних культурах - Секреція в середовище, легке очищення | <ul style="list-style-type: none"> - Вища складність і вартість (складні середовища) - Довші терміни виробництва, повільний ріст - Дороговартісні реактиви | <ul style="list-style-type: none"> - Chinese Hamster Ovary (CHO) K1 оптимізований для суспензійної культури; використовується для rFIX (вихід 1-3 г/л). - Human Embryonic Kidney (HEK) 293 для транз'єнтної експресії; приклад – rFVIIa (вихід 0,5 г/л). | <p>Можлива для обох субодиниць А та В завдяки подібним ПТМ до людських (глікозилювання, згортання); використовується для складних білків; потенційно дозволяє складання гетеротетрамеру, але дорожче, не використовується комерційно</p> |
| Безклітинні системи | <ul style="list-style-type: none"> - Гнучкі - Обходять біохімічні обмеження клітин - Метаболічні / цитотоксичні навантаження відсутні | <ul style="list-style-type: none"> - Дорогі - Нижчий врожай порівняно з клітинними системами - Складне та тривале масштабування - Не точні ПТМ, зокрема складне глікозилювання | <ul style="list-style-type: none"> - Система екстракт <i>E. coli</i> для отримання токсичних білків; модифікація - використання очищених компонентів для точного контролю середовища. - Система зародки пшениці для отримання великих білків; відсутність ендогенних білків для чистоти. | <p>Можлива для швидкого прототипування субодиниць А та В індивідуально; обмежена для складних ПТМ та збірки комплексу; підходить для лабораторних досліджень, але не для промислового виробництва через низький врожай.</p> |

| | | | | |
|---------------------------------|--|---|--|---|
| Рослинні клітини | <ul style="list-style-type: none"> - Економічна (можливість вирощувати на полях) - Масштабована (великий вихід біомаси) - Мінімальне забруднення патогенами тварин - ПТМ подібні до ссавців (глікозилювання, але без сіалування) | <ul style="list-style-type: none"> - Труднощі в регуляції рівнів експресії - Не підходить для білків з людськими ПТМ - Складна екстракція та обробка - Повільний ріст, сезонність | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Nicotiana benthamiana</i>, модифікація - транз'єтна (агробактерії), отримання rFVIII; врожайність 0,1 г/кг. - <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0, Стабільна трансгенія, отримання ферментів. | Обмежена через відмінності в глікозилюванні (імуногенні цукри); потенційно можлива для А, але не оптимальна для В або комплексу; потребує глікоінженерії для людських ПТМ, комерційно не використовується |
| Клітини комах | <ul style="list-style-type: none"> - Забезпечує правильне згортання та активність - Високий врожай для більшості білків - Здатність до ПТМ - Підходить для білків високої молекулярної маси | <ul style="list-style-type: none"> - Спеціалізовані середовища та обладнання - Низькомолекулярне глікозилювання - Дорогі та складні в масштабуванні | <ul style="list-style-type: none"> - Штам Sf9; продукт вакцина Cervarix (HPV); модифікація - бакуловірус-опосередкована експресія для великих вставок ДНК та коекспресії. - Штам High Five; продукт рекомбінантні білки; вищі врожаї для деяких білків з глікозилюванням. | Можлива для субодиниці А з ПТМ (подібні до ссавців, але простіші глікани); обмежена для В через відмінності в глікозилюванні; використовується для вірусних білків, але не стандарт для FXIII. |
| Трансгенні комахи (EntoEngine™) | <ul style="list-style-type: none"> - Оптимізована для складних білків - Легко масштабувати - Економічна - Гнучка - Здатність до ПТМ - Багато генетичних інструментів | <ul style="list-style-type: none"> - Довші терміни виробництва - Відмінності в ПТМ порівняно з ссавцями - Складна екстракція білків - Відсутність транз'єнтної експресії | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Drosophila melanogaster</i>; продукт фактор росту (з корів); модифікація - система UAS/GAL4 для точного контролю експресії в тканинах, комбінована з пропрієтарними інноваціями для оптимізації. - EntoEngine™; продукт еритропоєтин; модифікація - трансгенна інтеграція для стабільної експресії з глікозилюванням, подібним до ссавців. | Потенційно підходить для обох субодиниць завдяки подібним ПТМ до ссавців (глікозилювання); дозволяє економічне масштабування; EntoEngine™ оптимізований для складних, токсичних білків, але не використовується для FXIII |

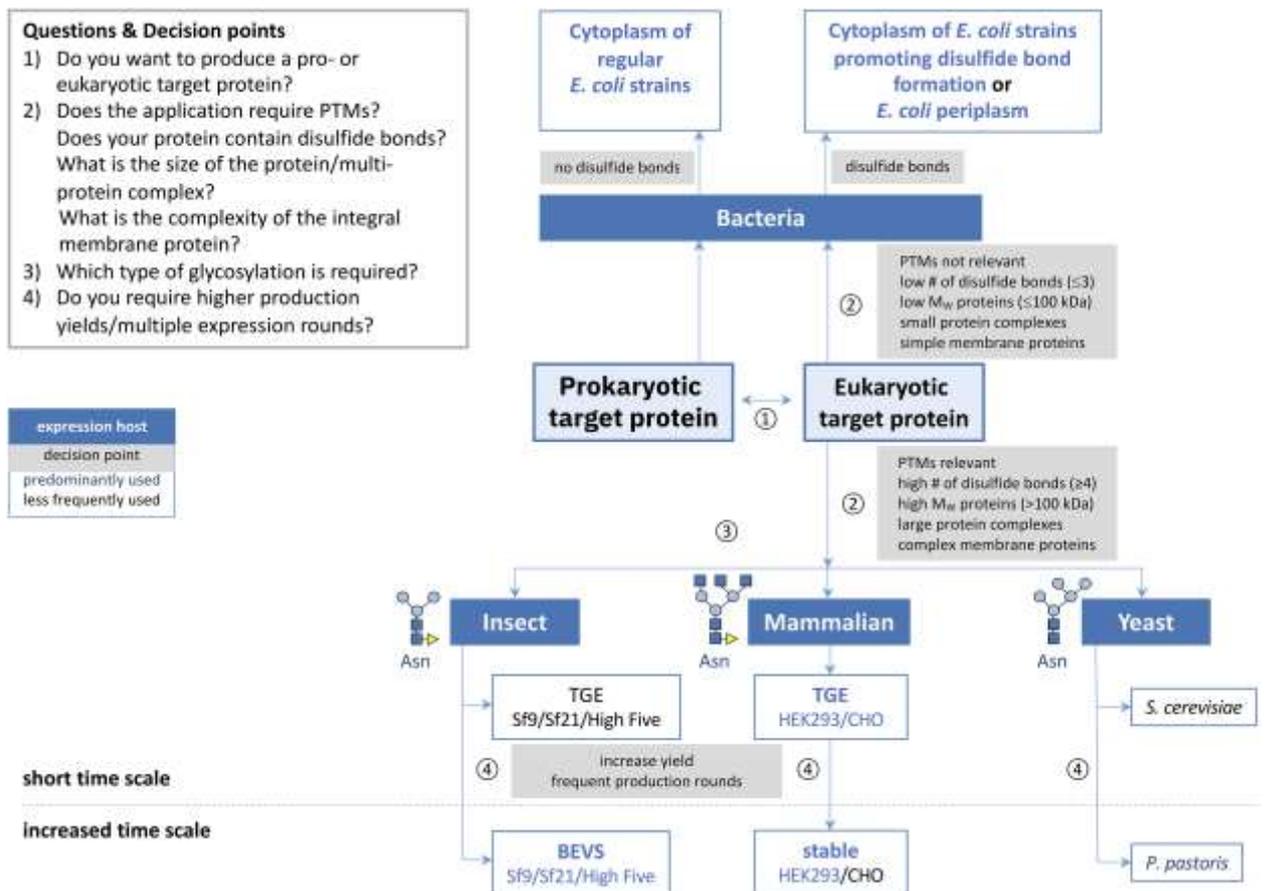


Рис. 3.1 – Схема прийняття рішень для вибору системи експресії генів (Ілюстрація взята з [13]). Позначки на схемі: темно-синій – система експресії, сірий – точка прийняття рішення

Схема прийняття рішень базується на чотирьох ключових пунктах (Decision Points 1–4), які враховують походження білка, необхідність посттрансляційних модифікацій (ПТМ), дисульфідні зв'язки, розмір, статус інтегрального мембранного білка (ІМР), тип глікозилювання та потреби в виході / циклах експресії. Схема є деревом рішень, де рекомендації ведуть до систем: *E. coli* (для простих білків), дріжджі (для еукаріотичних без гліканів ссавців), клітини комах (BEVS або транзйентні), клітини ссавців (для складних ПТМ).

Згідно з цією схемою проведемо вибір оптимальної системи експресії для цільового білка – рекомбінантного фактора крові rFXIII. FXIII – це трансглютаміназа, яка циркулює в плазмі як тетрамер з двох субодиниць А і В. Субодиниці FXIII-В вільно присутні в плазмі в робочих кількостях, тому

введення лише субодиноці A_2 є достатнім, оскільки вона швидко зв'язується з ендogenous субодиноцею В у плазмі пацієнта, утворюючи стабільний комплекс. Крім цього слід зазначити, що дефіцит FXIII викликає рідкісне захворювання загортання крові, головним чином через мутацію в субодиноці FXIII-A, як було показано в розділі 2. Тому як цільовий білок розглядаємо саме субодиноцю А FXIII.

Рекомбінантний фактор XIII субодиноці А – це еукаріотичний білок людського походження (гомодимер A_2 , молекулярна маса мономера -83 кДа, димера 166 кДа), який не глікозильований у природній формі, має 2 інтрамолекулярні дисульфідні зв'язки на мономер, є розчинним цитоплазматичним білком (не відноситься до інтегрального мембранного білка) і не вимагає складних ПТМ для функціональності (N-термінальна ацетиляція імітується генетично). Виробництво вимагає промислового масштабу для терапевтичного застосування.

Базуючись на відомостях щодо будови та властивостей FXIII, наведених у розділі 2, дамо відповіді на питання схеми для rFXIII:

1. Який цільовий білок необхідно отримати: прокаріотичний або еукаріотичний? Еукаріотичний, rFXIII є людським білком, синтезованим у еукаріотичних клітинах у природі, з еукаріотичним фолдингом і димеризацією.

2. Чи потребує застосування білка посттрансляційних модифікацій (ПТМ)? Ні, не вимагає функціональних ПТМ для базової активності. Природна А-субодиноця FXIII не глікозильована, ацетиляція N-терміналу імітується в рекомбінантній формі; активація тромбіном відбувається посттрансляційно *in vivo*, але не в системі експресії.

Чи містить білок дисульфідні зв'язки? Так, 2 інтрамолекулярні дисульфідні зв'язки на мономер (Cys238-Cys394 та Cys327-Cys367), які важливі для стабільності, але не міжсубодиночні.

Який розмір білка/мультибілкового комплексу? Мономер 83 кДа, димер 166 кДа.

Яка складність інтегрального мембранного білка? Не є інтегральним мембранним білком; це розчинний цитоплазматичний білок без трансмембранних доменів.

3. Який тип глікозилювання потрібен? Природний FXIII A-субодиниця не глікозилюваний; відсутність глікозилювання не впливає на функцію, тому не потрібні ні комплексні (савці), ні пауциманнозні/олігоманнозні (комах), ні гіперманнозні (дріжджові) глікани.

4. Чи потрібен високий вихід продукту / багаторазові цикли експресії? Так, для комерційного виробництва, потрібні високі виходи 1-2 г/л і багато циклів для промислового масштабування; терапевтичне застосування вимагає стабільного, повторюваного процесу з високою чистотою >99%.

Вибір системи експресії для виробництва rFXIII згідно зі схемою:

Decision Point 1: Походження білка (прокаріотичний чи еукаріотичний)? Еукаріотичний → Переходимо до Decision Point 2 (не рекомендується відразу *E. coli*, оскільки еукаріотичний білок може вимагати еукаріотичного фолдингу).

Decision Point 2: Чи можна виробляти в *E. coli*? (Перевірка: відсутність функціональних ПТМ/глікозилювання, ≤ 3 дисульфідних зв'язків, MW (Мм) ≤ 100 кДа, малі IMP ≤ 100 кДа). Ні (хоча ПТМ не потрібні, дисульфідні зв'язки = 2 (≤ 3), але Мм димера = 166 кДа (> 100 кДа), і як еукаріотичний білок, може мати проблеми з фолдингом/димеризацією в прокаріотах; у літературі спроби в *E. coli* призводили до утворення тілець включень та низької активності). → Переходимо до Decision Point 3.

Decision Point 3: Який тип гліканів потрібен для функціональності? (савців комплексні або комах пауциманнозні/олігоманнозні або дріжджові гіперманнозні). Жоден специфічний (відсутність глікозилювання прийнятна, немає потреби в гліканах савців з гілками GlcNAc/галактоза/фукоза/сіалова кислота). → Рекомендується клітини комах (BEVS) або дріжджі (як альтернатива для еукаріотичних білків без гліканів савців; дріжджі можуть давати гіперманнозні глікани, але оскільки глікозилювання не потрібне, це не

проблема, якщо уникнути сайтів глікозилювання генетично).

Decision Point 4: Потреба в високому виході/повторювальних циклах експресії? (TGE – швидше, але нижчі виходи; стабільні лінії/BEVS – вищі, але довше). Так → Для рекомендованих систем (клітини комах/дріжджі) обираємо BEVS або дріжджі (зазвичай епізомальні/інтегровані вектори для високих виходів).

Таким чином, оптимальним варіантом для виробництва рекомбінантної субодиниці A rFXIII, враховуючи економічність та ефективність є дріжджова система. Дослідження з використанням дріжджів як гетерологічної системи експресії rFXIII-A почалися ще у 1990-х роках. Так, у роботі Jagadeeswaran P. з колегами [51] rFXIII було одержано з використанням дріжджів як гетерологічної системи експресії. Для реалізації біосинтезу було сконструйовано спеціалізований дріжджовий експресійний вектор рРНЗ. Плазмідна конструкція містить такі функціональні елементи: двоспрямований промотор GAL1-GAL10, ділянку множинного клонування (MCS), селективний маркер URA3 для відбору трансформантів, 2 μ -послідовності для автономної реплікації в дріжджових клітинах та ген стійкості до ампіциліну для селекції в бактеріальних системах. Повнорозмірну кДНК фактора XIII людини було інтегровано у PstI-сайт вектора рРНЗ. Отриманою генетичною конструкцією трансформували клітини дріжджів.

Для виробництва rFXIII-A спеціалізованим штамом є *Saccharomyces cerevisiae* ZM118 завдяки модифікаціям, що зменшують протеоліз і покращують стабільність плазмід [39, 49, 55, 69]. Для подібних біотехнологічних задач існують альтернативні штами як у межах *S. cerevisiae*, так і в інших видах дріжджів. Ці штами є близькими за генетикою до ZM118, але з різними модифікаціями для оптимізації експресії. Вони часто використовуються для виробництва терапевтичних білків, ферментів або антитіл. Зокрема, такі штами як AN22 (протеазо-дефіцитний штам, має переваги в зменшенні деградації білків), INVSc1 (штам з високою толерантністю до стресу, підходить для експресії складних білків), CEN.PK

530-1С (штам з плазмідами на базі POT1 (для стабільної експресії в середовищах з глюкозою), VJ5464 (протеазо-дефіцитний штам, часто застосовується для мембранних білків або тих, що потребують правильного фолдингу) [32, 37], але незважаючи на їхні переваги, основним комерційним варіантом для промислового виробництва залишається простий для цього застосування та економічний ZM118.

Хоча серед дріжджових систем виробництво rFXIII-A у промислових масштабах здійснюється з використанням *Saccharomyces cerevisiae*, було проведено достатньо досліджень і з *Pichia pastoris*. Так, у дослідженнях Park D.-S. з колегами [71] для гетерологічної експресії рекомбінантної про-форми субодиниці фактора згортання крові XIII (pro-FXIIIa) було використано систему метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris* (штам GS115, his4). Генетичну матрицю для цільового білка (α -субодиниця FXIII разом із активаційним пептидом) було виділено з бібліотеки кДНК плаценти людини. Процес біосинтезу базувався на використанні інтегративного вектора, де цільовий ген був розташований безпосередньо після потужного індукованого промотора алкогольоксидази (AOX1). Така стратегія забезпечувала високий рівень транскрипції у відповідь на введення метанолу як індуктора. Сконструйована система забезпечувала секрецію рекомбінантного продукту безпосередньо в культуральне середовище, що значно спрощувала подальші етапи екстракції та очищення.

Слід зазначити, що виробництво субодиниці А rFXIII також було проведено і в інших системах, наприклад у суспензійних культурах клітин тютюну (NT-1) та в цілих рослинах *Nicotiana tabacum* [47], в клітинах ссавців СНО [72], але в промисловому масштабі вони не використовуються через обмеження наведені вище та згруповані у табл. 3.1.

Як було зазначено вище немає доцільності у виробництві субодиниці В FXIII у промисловому масштабі через достатнє циркулювання у пацієнта, крім цього виробництво стикається з технічними викликами через складну структуру білка (10 Suchi-доменів із 20 дисульфідними зв'язками). Тому,

аналізуючи потенційну систему експресії для субодиноці В, на відміну від субодиноці А, яку можна отримати навіть в *E. coli*, хоча і з певними обмеженнями [68], FXIII-B потребує системи, здатної до складної ПТМ та правильного фолдингу дисульфідних містків. Саме тому для рекомбінантного виробництва субодиноці В частіше використовуються системи експресії ссавців. rFXIII-B використовують у дослідженнях, наприклад, для вивчення станів олігомеризації та взаємодії з субодиноцею А. Наприклад, у дослідженнях Singh S. з колегами [53] одержання рекомбінантної субодиноці В фактора XIII (rFXIII-B) здійснювали шляхом гетерологічної експресії в еукаріотичній системі на основі клітинної лінії ембріональної нирки людини HEK293t. Клітини культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) з високим вмістом глюкози, доповненому 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби, 1% суміші антибіотиків пеніцилін-стрептоміцину та 0,1% фунгізону. Культивування проводили за стандартних умов у CO₂-інкубаторі при температурі 37 °C та вмісті CO₂ 5%. Для забезпечення високої ефективності трансфекції та генетичної стабільності використовували перещеплені клітини в логарифмічній фазі росту. Генетичну трансформацію клітин здійснювали методом ліпосомальної трансфекції. Для цього використовували вектор експресії ссавців pReciever-M01, що містив вставку кДНК людського FXIII-B. Процедура передбачала введення комплексу, що складався з плазмідної ДНК та реагенту Lipofectamine 2000, у суспензію клітин. Оскільки цільова субодиноця rFXIII-B є секреторним білком, збір продукту здійснювали після трансфекції шляхом відбору позахромосомної (екстрацелюлярної) фракції. Отриману фракцію центрифугували для видалення клітинних залишків, після чого супернатант концентрували, а рекомбінантний білок очищували імуноафінною хроматографією.

Таким чином, дослідження FXIII-A більш зосереджені на промислово отриманих білках для терапевтичних цілей, тоді як дослідження рекомбінантного FXIII-B частіше мають фундаментальний характер - для

вивчення структурної ролі Sushi -доменів, механізмів збірки тетрамера, тощо.

3.2 Обґрунтування технології виробництва rFXIII

Сучасний ринок рекомбінантних препаратів фактора згортання крові XIII представлений препаратами Tretten та NovoThirteen (розробка компанії ZymoGen, пізніше передана компанії Novo Nordisk), що є ідентичними продуктами на основі катридекакогу (catridecascog). Даний аналіз базується на регуляторних даних FDA та EMA (офіційні монографії продукту), а також наукових публікаціях та патентах компанії-виробника, що описують біотехнологічний цикл отримання активної А-субодиниці фактора XIII [39, 49, 51, 61, 62, 69, 80, 81].

1. Характеристика цільового продукту та його біологічна структура

Рекомбінантний фактор XIII (rFXIII) – генетично синтезований гомодимер А₂-субодиниці людського FXIII. Кожна мономерна субодиниця складається з 731 амінокислот (молекулярна маса 83,2 кДа), з ацетильованим N-термінальним серином. Структура ідентична природній людській А-субодиниці з плаценти або плазми, але без посттрансляційних модифікацій, таких як глікозилування або дисульфідні зв'язки. При активації тромбіном відщеплюється N-термінальний пептид (37 амінокислот), перетворюючи rFXIII на активну форму rFXIIIa, яка стабілізує фібринові згустки шляхом крос-лінкінгу.

На відміну від систем експресії ссавців, виробництво в дріжджах дозволяє отримати білок без зайвих ПТМ, які не є критичними для функціонування FXIII, але можуть впливати на його імуногенність. Механізм дії rFXIII ідентичний ендogenous: під дією тромбіну та іонів Ca²⁺ відбувається відщеплення активаційного пептиду (37 амінокислот), що перетворює профермент на активну трансглютаміназу (FXIIIa). Останній забезпечує утворення ковалентних зв'язків між фібриновими нитками, стабілізуючи згусток.

Перевагами рекомбінантної форми є: відсутність ризику передачі інфекцій (ВІЛ, гепатит), висока чистота (>99%), стабільність і контрольована структура.

Препарат випускається як ліофілізований порошок (2500 МО/флакон, 15 мг), розчинюється в стерильній воді для ін'єкцій (концентрація 667-1042 МО/мл після розчинення). Стабілізатори: сахароза (174 мг), натрію хлорид (8,7 мг), L-гістидин (9,3 мг), полісорбат 20 (0,3 мг). рН розчину 8,0; рІ=5,9; розчинність висока при рН>7. Склад розчину оптимізований для збереження стабільності гомодимеру та запобігання агрегації білка.

2. Характеристика системи експресії *Saccharomyces cerevisiae*

Для виробництва rFXIII було обрано еукаріотичну систему на основі дріжджів *S. cerevisiae*. Вибір цього продуцента здійснено вище та зумовлений його статусом GRAS (безумовно безпечний), високою швидкістю росту та здатністю забезпечувати правильний фолдинг білка у цитозолі. За основу взяті оригінальний штам та технологія, що використовуються у промисловому виробництві rFXIII-A (catridecacos) [49, 69].

У виробництві використовується позахромосомний вектор pD16, сконструйований на основі природної дріжджової 2μ-плазміді. Перевагами такого вектора є стабільність без інтеграції в геном (уникає мутагенезу) та висока копійність для ампліфікації експресії. Висока копійність вектора (50–100 копій на клітину) гарантує високий рівень експресії цільового гена. Основні елементи експресійної касети містять ген цільового білка, промотор, термінатор, селективний маркер. Ген цільового білка – κДНК людського плацентарного FXIII (A-субодиниця) (з ацетильованим N-терміналом для імітації природної форми) – клоновано з відомих послідовностей [18]. Ген вставлено в плазмиду pD16, яка містить промотор ADH2-4с, термінатор TPI1 та селективний маркер POT1.

Класичним рекомбінантним штамом, який використовувався компанією ZymoGenetics для отримання rFXIII (з урожайністю до 50–60 г/л клітин у ферментерах) та інших білків, є штам *S. cerevisiae* ZM118, з такими

характеристиками: MAT α /MAT α диплоїдний – має обидві алелі MAT α і MAT α в гетерозиготному стані, що робить його стабільним і неспроможним до спаровування з іншими штамми; містить наступні мутації: leu2-3,112 (подвійна мутація в гені LEU2, який кодує фермент β -ізопропілмалатдегідрогеназу, необхідний для біосинтезу амінокислоти лейцину, що робить штам ауксотрофним по лейцину); ura3 (мутація в гені URA3, який кодує оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу, задіяну в біосинтезі урацилу, штам ауксотрофний по урацилу); trp1::URA3+ (інсерційна мутація в гені TRP1, який кодує триозофосфатізомеразу – ключовий фермент гліколізу); bar1 (мутація в гені BAR1, який кодує позаклітинну протеазу, що розщеплює α -фактор); pep4::URA3+ (інсерційна мутація в гені PEP4, який кодує протеїназу А, необхідну для активації інших вакуолярних протеаз, вставка URA3+ руйнує PEP4, зменшуючи протеолітичну активність у вакуолях, що робить штам придатним для експресії рекомбінантних білків, оскільки зменшує їх деградацію, також служить маркером); [cir $^{\circ}$] - штам вільний від 2 μ -плазмиди, яка у дикому типі збільшує стабільність інших плазмід, але її відсутність робить штам придатним для досліджень, де потрібно контролювати плазмідну копійність або уникнути інтерференції [39, 49, 55, 69]. ZymoGenetics була придбана Bristol-Myers Squibb у 2010 р., надалі технологія на базі ZM118 перейшла до Novo Nordisk, яка комерціалізувала rFXIII у 2013 році. Штам використовується як у промисловості, так і у наукових дослідженнях [39, 55].

Як промотор, окрім сильного промотора ADH2 (алкогольдегідрогенази 2) [22], який активується специфічно при вичерпанні глюкози в середовищі, для конститутивної експресії використовували TEF1/TEF2 (трансляційний елонгаційний фактор) [77], також можливе використання конститутивного промотора TRP1 (триозофосфатізомеразу), що використовується для стабільної експресії генів у дріжджів в різних умовах [66]. Як селективний маркер використовують TRP1 (триптофан синтетаза) або POT1 (для штамів з мутацією trp1, де селекція на глюкозі), що забезпечують стабільне збереження

плазміді в промислових штаммах без використання антибіотиків. Для FXIII лідерна послідовність відсутня, оскільки білок інтрацелюлярний. Це ж виключає ризик гіперманозилування, яке могло б виникнути при проходженні білка через секреторний шлях дріжджів, і забезпечує отримання білка у розчинній, біологічно активній формі.

3. Етапи виробництва rFXIII-A

Стадія 1. Клонування та трансформація S. cerevisiae. Процес створення штаму-продуцента починається з етапу молекулярного клонування, під час якого цільовий ген, що кодує FXIII-A, інтегрується у експресійний вектор pD16 під контроль промотора, який забезпечує ефективний запуск транскрипції в дріжджових клітинах. Після конструювання рДНК проводиться процедура трансформації клітин *S. cerevisiae*. Для проникнення плазміді крізь клітинну стінку зазвичай використовують метод електропорації, що створює тимчасові пори в мембрані під дією струму, або хімічний метод із застосуванням ацетату літію, який підвищує проникність клітин. Наступним кроком є селекція трансформованих клітин. Оскільки не всі дріжджі поглинають плазміду, культуру висівають на вибіркоче середовище: якщо вектор містить маркер TRP1, використовують середовище без триптофану, а у випадку використання системи P0T1 – середовище з глюкозою, де здатні вижити лише клітини з вбудованим вектором. Завершується технологічний цикл відбором найбільш активних колоній та їх культивуванням для отримання стабільного штаму-продуцента, здатного до постійного та відтворюваного синтезу rFXIII-A у промислових масштабах. Трансформовані клітини зберігаються у замороженому вигляді у аліквотах по 2 мл.

Стадія 2. Підготовка живильних середовищ. Технологія виробництва rFXIII в дріжджах рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* передбачає використання двох основних середовищ для ферментації: селективного середовища для підготовки посівного матеріалу та основного ферментаційного середовища. Ці середовища оптимізовані для росту штаму ZM118/pD16, який є ауксотрофним, і забезпечують високу щільність клітин

(до 50-60 г/л) при контрольованому рН, температурі та живленні [49, 69].

Селективне середовище для посівного матеріалу – стартове середовище повинно забезпечувати відновлення штаму з замороженого стану після зберігання. Воно селективне (без лейцину або триптофану, залежно від маркера) для підтримки стабільності плазмиди pD16 (з POT1-маркером), яка компенсує дефіцит амінокислот, і запобігання втраті трансформованих клітин. Без селекції плазміда може втрачатися, знижуючи вихід rFXIII. Середовище повинно містити велику кількість джерел живлення – вуглецю, азоту, мінерали, вітаміни, амінокислоти для контрольованого росту, забезпечуючи високу життєздатність посівного матеріалу перед переносом у великий об'єм.

Основне ферментаційне середовище – виробниче середовище для масового росту клітин повинно містити високу концентрацію джерел азоту, зокрема дріжджового екстракту для досягнення високої щільності клітин, також висока концентрація солей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та KH_2PO_4 забезпечує основу для синтезу білків та нуклеїнових кислот. Для забезпечення енергетичного обміну дріжджів обов'язкова присутність комплексу вітамінів, зокрема біотину, тіаміну, пантотенату кальцію, а для функціонування ферментних систем клітини – наявність іонів цинку, заліза, марганцю та міді. Процес ферментації оптимізований з двоетапним підживленням джерел вуглецю (спочатку глюкоза для швидкого нарощування біомаси, потім етанол як джерело вуглецю, що часто використовується для стимуляції певних промоторів (ADH2) та підтримки життєздатності клітин при високій щільності), що стимулює метаболізм і експресію під промотором ADH2-4с.

При отриманні живильних середовищ потрібно підтримувати конкретні оптимальні для штаму фізико-хімічні параметри, зокрема рН на рівні 5,0–5,5 (за допомогою буферизації лимонною кислотою та гідроксидом амонію) та піногасіння (за допомогою додавання піногасників, наприклад поліолів – поліпропіленгіколя, ППГ).

2.1 Приготування суміші амінокислот 1. Змішати аденін (4 г), урацил (3 г), триптофан (2 г), гістидин (8 г), аргінін (2 г), метіонін (2 г), тирозин (3 г),

лізин (3 г), фенілаланін (5 г).

2.2 Приготування суміші амінокислот 2. Змішати по 5 г аланіну, аспарагіну, аспарагінової кислоти, цистеїну, глутаміну, глутамінової кислоти, гліцину, ізолейцину, проліну, серину, треоніну, валіну.

2.3 Приготування розчину мікроелементів. Розчинити в 4 л дистильованої води з 50 мл HCl конц. $ZnCl_2$ (3,40 г), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (27,00 г), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (9,55 г), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,10 г), $CoCl_2$ (1,29 г), H_3BO_3 (0,31 г), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0,01 г), KI (0,01 г); довести до 5 л.

2.4 Приготування розчину вітамінів. Розчинити в 200 мл дистильованої води (pH 5,0): D-біотин (5 мг), тіамін (80 мг), піридоксин (80 мг), мезо-інозитол (1500 мг), Са-пантотенат (1500 мг), ніацинамід (60 мг), фолієву кислота (10 мг), рибофлавін (20 мг), холін (100 мг).

2.5 Приготування селективного середовища для посівного матеріалу. Розчинити в дистильованій воді основні компоненти: $(NH_4)_2SO_4$ (10 г/л), KH_2PO_4 (5 г/л), $MgSO_4$ (5 г/л), NaCl (1 г/л), $CaCl_2$ (0,5 г/л), суміш амінокислот 1 (3,68 г/л), суміш амінокислот 2 (3,68 г/л), розчин мінералів (10 мл/л), лимонну кислоту (4,29 г/л), ППГ-2025 (0,1 мл/л). Змішати основні компоненти, відрегулювати pH до 5,0, стерилізувати при 121 °C 30 хв. Перед використанням додати 5 мл/л розчину вітамінів, простерилізований через фільтр, що стоїть на вході до основного ферментеру.

2.6 Приготування основного ферментаційного середовища. Розчинити дріжджовий екстракт (60 г/л), солі $(NH_4)_2SO_4$ (10 г/л), KH_2PO_4 (5 г/л), $MgSO_4$ (5 г/л), NaCl (1 г/л), $CaCl_2$ (0,5 г/л), ППГ-2025 (0,1 мл/л), відрегулювати pH до 5,0, стерилізувати при 121 °C 30 хв. Після охолодження додати розчини мікроелементів та вітамінів. Перед ферментацією додати глюкозу (0,5%) для старту.

Стадія 3. Ферментація *S. cerevisiae*.

3.1 Отримання посівного матеріалу. Заморожений штам дріжджів переносять у інокулятор з селективним середовищем та вирощують 26 год при 30 °C з аерацією перемішуванням 300 об/хв.

3.2 Виробнича ферментація. Отриманий посівний матеріал використовували для засіву ферментера із основним ферментаційним середовищем. Згідно з технологією, що забезпечує отримання rFXIII (катрідекакогу) з високим виходом, ферментацію проводять протягом 63,5 год із підживленням глюкозою (протягом 19 годин – 21 мл/л·год розчину 50% глюкози/5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, з подальшим збільшенням швидкості протягом 7 год до 142,6 мл/год). Починаючи з 31-ї години, вводять підживлення етанолом (58,7 мл/год 95% етанолу). Рівень рН підтримують на позначці 5,5 шляхом додавання 4М NH_4OH . Піноутворення контролюють автоматичною подачею піногасника. Ферментацію здійснюють при швидкості перемішування 550–600 об/хв, тиску у апараті підтримували на рівні 0,51 атм для запобігання потраплянню зовнішнього повітря усередину, максимальному парціальному тиску O_2 40%, рівні розчиненого кисню ($d\text{O}_2$) більше 15% (підтримується автоматично, якщо він впаде нижче, клітини почнуть відчувати гіпоксію, що призведе до зниження швидкості росту клітин, зміни метаболізму (перехід на анаеробне дихання та надмірне накопичення лактату), зниження виходу та якості рекомбінантного білка). Максимальне накопичення білка відбувається у стаціонарній фазі росту дріжджів. За оригінальною технологією при заданих умовах щільність клітин досягає 50-60 г/л [49, 69].

Стадія 4. Збір та лізис клітин. Оскільки rXIII-A у системі *S. cerevisiae* накопичується внутрішньоклітинно, критичним етапом є руйнування міцної глюкоано-маннанової клітинної стінки дріжджів для вивільнення цільового білка, що здійснюється після етапу концентрації отриманої у ферментері культуральної рідини.

4.1 Концентрація біомаси. Оскільки цільовий продукт (rFXIII-A) знаходиться всередині клітин, стадія концентрування має бути максимально швидкою та «м'якою» для уникнення передчасного лізису та деградації білка. Культуру охолоджують до 15-20 °С, відділення клітин від культурального середовища здійснюють центрифугуванням (Westfalia або Alfa Laval) у безперервному потоці або тангенціальною фільтрацією (половолоконні

фільтраційні модулі Microgon 0,2 мкм затримують клітини дріжджів), отримуючи концентрат вологих клітин у деіонізованій воді. При сепарації за допомогою дискових центрифуг для *S. cerevisiae* підбирають фактор розділення у межах 5000–8000. Важливо використовувати моделі з охолоджувальною сорочкою для підтримки температури нижче 20 °С. При використанні модулів Microgon культуральна рідина циркулює паралельно поверхні мембрани, що запобігає швидкому утворенню шару осаду. Замість половолоконних модулів можна використовувати касетні системи (наприклад, Sartorius Sartocon або Pall Centramate). При відділенні біомаси дріжджів також використовують вакуум-фільтрацію на барабанних фільтрах, що представляють собою обертовий барабан, покритий фільтрувальним матеріалом, частково занурений у суспензію. Вакуум витягує рідину крізь шар дріжджів. Цей метод дозволяє отримати дуже густу пасту дріжджів (до 25–30% сухих речовин), але існує ризик мікробної контамінації, так як складно забезпечити повну стерильність, а також вищий механічний стрес для клітин порівняно з тангенціальною фільтрацією. Так як тангенціальна фільтрація забезпечує кращий захист rFXIII-A від протеолізу (клітини менше травмуються під час концентрування) цей метод пропонується як основний [15, 69].

За технологією при пересіві 0,7 л посівного матеріалу у 60 л основного ферментаційного середовища отримують 3-3,375 кг вологої біомаси (концентрація 50-56 г/л) [49, 69].

4.2 Лізис клітин. Руйнування клітин здійснюють механічною гомогенізацією (дезінтеграція) або ферментативно з β -глюканазою для руйнування клітинної стінки. Гомогенізацію можна проводити високим тиском у гомогенізаторах високого тиску, ультразвуком в ультразвукових дезінтеграторах, або у бісерних млинах, в яких невеликі скляні кульки забезпечують максимальну кількість точок зіткнення з клітинами. У промислових масштабах доцільно використовувати гомогенізатори високого тиску (наприклад, APV Gaulin або GEA Niro Soavi), всі інші апарати більш

доцільні на етапі лабораторних досліджень або при малотоннажному виробництві.

Вологу біомасу клітин розводять до 40% у буфері для екстракції цільового білка наступного складу: 50 мМ Tris-HCl pH 7,0-7,8, 150 мМ NaCl, 5-15 мМ ЕДТК, 10 мМ 2-МЕ, 1 мМ ФМСФ [69]. Tris-HCl – буферна основа, яка підтримує сталий рівень кислотності pH 7,0–7,8. NaCl створює іонну силу розчину, що відповідає фізіологічним умовам. Це допомагає підтримувати білок у розчиненому стані, запобігаючи неспецифічній агрегації та випаданню в осад. ЕДТК – етилендіамінтетраоцтова кислота виступає як хелатуючий агент для зв'язування іонів двовалентних металів, зокрема Ca^{2+} . Це необхідно для запобігання передчасній активації або агрегації FXIII під час виділення. Оскільки Ca^{2+} необхідний для дисоціації субодиниць та активації FXIII, його видалення за допомогою ЕДТК стабілізує білок у неактивній формі. Також ЕДТК інгібує металопротеази, які могли б розщепити цільовий білок. 2-МЕ – 2-меркаптоетанол застосовується як сильний відновлювальний агент. Запобігає окисленню залишків цистеїну в структурі білка. Оскільки субодиниця А містить 9 залишків цистеїну, включаючи активний центр (Cys314), які не утворюють дисульфідних зв'язків у нативному стані, відновник необхідний для підтримки цих груп у вільному стані та збереження ферментативної активності. ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид використовується як незворотний інгібітор серинових протеаз. Під час лізису клітин вивільняється велика кількість протеаз організму-господаря. ФМСФ додається, щоб вони не зруйнували rFXIII у процесі його виділення.

Використання гомогенізаторів високого тиску базується на різкому перепаді тиску при проходженні суспензії через вузький регульований клапан. Коли дріжджова суспензія виходить із клапана на високій швидкості (до 500 м/с), клітини зазнають впливу трьох сил: сил зсуву через тертя шарів рідини один об одного, турбулентності через хаотичний рух потоку, кавітації через утворення та миттєвого схлопування бульбашок пари, що «підриває» міцну клітинну стінку дріжджів. В апараті підтримується тиск 100-150 МПа,

швидкість потоку 60-150 мл/хв. Зазвичай проводять 2-3 цикли, так як один прохід руйнує лише 40-60% клітин дріжджів, тому суспензію пропускають через апарат кілька разів. При стисненні рідина нагрівається, а оскільки rFXIII-A чутливий до тепла, на виході з гомогенізатора обов'язково встановлюється пластинчастий теплообмінник, який миттєво охолоджує лізат до температури нижче 10°C. Лізат розводять 1:3-1:5 холодною водою (рН 7,2) [15, 21, 69].

4.3 Очищення лізату. Цей етап забезпечує перехід від грубого клітинного гомогенату до частково очищеного розчину білка, придатного для завантаження на хроматографічну колонку. З цією метою пропонується використання сепарації (сепаратори Sharples або Sorvall при 8500–9000 об/хв) для видалення залишків клітин з преципітацією стрептоміцином сульфатом, який використовується для видалення нуклеїнових кислот (ДНК та РНК), що роблять лізат в'язким, та подальшим діалізом (мембрана Pellicon 100 кДа, оскільки А₂ димер має масу 160 кДа, а домішки легші). Процес проводять наступним чином: центрифугують (5000-9500 g); додають стрептоміцин сульфат (0,3 об'єму 7%), витримують 12 год при 4°C, центрифугують, концентрують і діалізують проти буферу (50 мМ Tris рН 7,4, 10 мМ 2-ME, 5 мМ ЕДТК) до електропровідності менше 5 мСм/см. Контроль електропровідності є важливим тому, що наступним етапом є іонообмінна хроматографія. Якщо провідність буде вищою (тобто солі буде забагато), іони солі «змагатимуться» з білком rFXIII-A за місце на сорбенті, і білок просто не зв'яжеться з колонкою, а вимийється в стік.

Замість центрифугування можна використовувати каскад глибинних фільтрів (наприклад, серії 3M Zeta Plus або Millipore Millistak+). Фільтри затримують дрібні клітинні залишки та частину ліпідів шляхом електростатичної адсорбції, що дає прозоріший розчин, але сам процес більш дорогавартісний через дорогі витратні матеріали. Альтернативою преципітації стрептоміцину сульфатом може бути нуклеазна обробка або поліетиленаміном. Фермент ендонуклеаза розщеплює нуклеїнові кислоти до коротких олігонуклеотидів. Це не створює осаду, який треба центрифугувати,

і не вимагає витримки, проте це дорожче за стрептоміцин. Осадження поліетиленіміном працює швидше за стрептоміцин, але потребує дуже точного дозування та контролю рН для попередження осадження rFXIII-A разом із ДНК. Альтернативою тангенціального діалізу може бути гель-фільтрація шляхом пропускання лізату через колонку з сорбентом типу Sephadex G-25. Це набагато швидше, ніж діаліз (хвилини замість годин), і дозволяє швидко змінювати, але такий процес важче масштабувати для великих об'ємів.

Стадія 5. Очищення цільового білка. Ця стадія містить багатоетапне очищення rFXIII-A, метою якої є досягнення фармацевтичного ступеня чистоти (>99%). Процес спрямований на видалення специфічних домішок: білків дріжджів-продуцентів, нуклеїнових кислот, ендотоксинів, а також активованої форми ферменту (фактора XIIIa), наявність якої у фінальному препараті не допускається [21, 39, 69].

5.1 Аніонообмінна хроматографія (АОХ). Початковий етап очищення базується на використанні аніонообмінника (наприклад, DEAE-Sepharose FF). Оскільки ізоелектрична точка rFXIII-A знаходиться в слабокислій області, при рН 7,2 білок має негативний сумарний заряд і ефективно сорбується на колонці. Низька провідність лізату (менше 3–4,5 мСм/см) є обов'язковою умовою для запобігання передчасній елюції солями. Після промивання буфером з додаванням антиоксидантів (2-МЕ) та хелатів (ЕДТК), білок елююють 0,12 М імідазолом (рН 5,8). Використання імідазолу при зниженому рН дозволяє м'яко змінити заряд білка та відокремити його від основної маси дріжджових протеїнів. Отриманий пул піків концентрують преципітацією сульфатом амонію (40% насичення), що є класичним методом концентрування білків із великих об'ємів елюату. Процес проводять наступним чином: лізат (провідність менше 3-4,5 мСм/см, рН 7,2) завантажують на колонку (2-100 л залежно від попередніх масштабів); промивають буфером (0,005 М ЕДТК, 0,05 М Tris-HCl рН 7,4, 0,01 М 2-МЕ); елююють 0,12 М імідазолом рН 5,8 з 5 мМ ФМСФ, 10 мМ 2-МЕ, 5 мМ ЕДТК; пул піків преципітують 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.2 Специфічна кристалізація. Унікальним етапом даної технології є кристалізація з ацетатом натрію. Додавання 11–12 % ацетату натрію при температурі 15 °С протягом 5–9 год ініціює формування кристалів rFXIII-A. Цей етап забезпечує надзвичайно високу селективність, оскільки більшість білків-забруднювачів залишаються в розчині. Процес проводять наступним чином: до фракції додають 11-12 % ацетату натрію при рН 6,2-7,5, 15 °С на 5-9 год; кристали центрифугують, промивають (10 мМ фосфатом натрію рН 6,7, 2 мМ ЕДТК, 11% ацетатом натрію) і розчиняють у буфері (10 мМ фосфат натрію, 2 мМ ЕДТК, 10 мМ гліцина рН 8,0).

5.3 Гідрофобна хроматографія (ГВХ). Наступним кроком є гідрофобна взаємодійна хроматографія на Phenyl-Sepharose FF. На відміну від АОХ, тут зв'язування відбувається за рахунок гідрофобних ділянок білка при високій іонній силі (60 мСм/см NaCl). Це дозволяє видалити агрегати білків та пірогени. Елюція проводиться зниженням концентрації солі (градієнт до гліцину). Процес проводять наступним чином: фракцію (провідність 60 мСм/см, рН 7,4) завантажують на колонку (60 л). Промивають 20 мМ фосфата натрію рН 7,4, 60 мСм/см NaCl, 2 мМ ЕДТК. Елюють градієнтом до 10 мМ гліцина, 1 мМ ЕДТК рН 7,4.

5.4 Друга АОХ. Для видалення залишкових слідів домішок використовується друга аніонообмінна хроматографія на потужнішому сорбенті Q-Sepharose FF. Це забезпечує розділення близьких за властивостями ізоформ білка. Процес проводять наступним чином: фракцію провідністю 11 мСм/см, рН 7,4 завантажують на колонку (30 л); промивають 10 мМ гліцином, 20 мМ фосфатом натрію, 1 мМ ЕДТК, 11 мСм/см NaCl рН 7,4; елюють градієнтом до 0,25 М NaCl.

5.5 рН-преципітація. Завершальне очищення перед фінальною стадією проводиться шляхом селективної преципітації при рН 5,8 за допомогою сукцинової кислоти. Витримка протягом 12 год при 5 °С дозволяє осаджувати цільовий білок, залишаючи розчинні дріжджові білки в супернатанті. Осад стабілізують додаванням аскорбату натрію (антиоксидант) та ПЕГ 8000.

Процес проводять наступним чином: до фракції додають 0,2-0,5 М сукцинову кислоту до рН 5,8; витримують 12 год при 5 °С, центрифугують; осад промивають буфером (0,05 М амонію сукцинат рН 5,8, 1% ПЕГ 8000, 0,005 М ЕДТК, 5 мМ аскорбата натрію) і розчиняють у 10 мМ гліцина, 20 мМ фосфата натрію, 1 мМ ЕДТК, 10 мМ NaCl рН 7,8.

5.6 Гель-фільтрація. Останнім етапом є ексклюзійна хроматографія на сорбентах Sephacryl S-200 або S-400. Це стадія «полірування», де білок розділяється за розміром молекул. Вона дозволяє: остаточно видалити димери, що розпалися, або агрегати; перевести rFXIII-A у фінальний фармакопейний буфер; видалити низькомолекулярні домішки та залишки реагентів попередніх стадій. Після проходження через колонку для гель-фільтрації детектор фіксує вихід білка у вигляді графічного піка. Оскільки білок вимивається не миттєво, а протягом певного часу, збирають декілька фракцій, що відповідають основній частині цього піка. Об'єднання цих фракцій у загальний об'єм називається «пулом піків». На цьому етапі білок дуже чистий, але занадто розведений для клінічного використання, тому його потрібно концентрувати. У цьому процесі пул піків концентрується на фільтрах 10000 Да до цільової концентрації. Використовується мембрана з порогом 10 кДа (10000 Дальтон), яка є абсолютно «непроникною» для цільового білка (молекулярна маса мономера rFXIII-A становить 80 кДа, а димера 160 кДа). Білок залишається над мембраною (ретинат), вода, солі та дрібні залишки реагентів вільно проходять крізь неї (пермеат).

Технологія передбачає можливість заміни стадії рН-преципітації на другу гідрофобну хроматографію (сорбенти Toyopearl Butyl 650 або Amberchrom CG 71). Застосування кристалізації в поєднанні з трьома типами хроматографії (АОХ, ГВХ, гель-фільтрація) дозволяє стабільно отримувати rFXIII-A з чистотою понад 99%. Хоча варіант із рН-преципітацією є економічно вигіднішим, перехід на другу гідрофобну хроматографію є більш перспективним для автоматизованих GMP-ліній, оскільки він мінімізує ручні операції з осадом та скорочує загальний час процесу очищення.

Процес проводять наступним чином: фракцію (20 г/л) завантажують на колонку (100-127 л); елюють 20 мМ фосфатом натрію, 1 мМ ЕДТК, 10 мМ гліцином, 0,1 М NaCl рН 7,8. Пул піків концентрують (10000 Да фільтр) [15, 21, 49, 69].

Стадія 6. Фінальна обробка та стабілізація.

6.1 Концентрація та діафільтрація. Після завершення хроматографічного очищення розчин rFXIII-A піддають концентруванню до рівня 25 г/л та діафільтрації. Використання 10 об'ємів діалізного буферу (10 мМ гліцину, 0,1 мМ ЕДТК, 2 % сахарози, рН 7,4) дозволяє повністю замінити робочий хроматографічний розчин на розчин для отримання лікарської форми. Гліцин у складі виступає як буферний агент та стабілізатор конформації білка; сахароза виконує роль кріопротектора та ліопротектора, захищаючи молекули rFXIII-A від денатурації під час заморожування та висушування; ЕДТК (0,1 мМ) додається в мінімальній концентрації для зв'язування випадкових іонів металів, що запобігає передчасній активації або окисленню білка.

6.2 Стерилізація розчину. Для забезпечення повної апірогенності та мікробіологічної чистоти проводиться стерильна фільтрація крізь мембрану з розміром пор 0,2 мкм. На відміну від термічної стерилізації, цей метод дозволяє зберегти нативну структуру термолабільного фактора XIII.

6.3 Ліофілізація. Стадія ліофілізації є ключовою для стабільності препарату. Процес включає попереднє заморожування при наднизьких температурах (-80°C) та тривале висушування під вакуумом при -20 °C протягом 48 год. Це дозволяє видалити воду, зберігаючи білкову структуру. Фінальне зберігання в атмосфері інертного газу (аргону) під вакуумом запобігає окислювальній деградації залишків цистеїну (Cys314).

6.4 Контроль якості. Отриманий rFXIII-A проходить суворий багатокомпонентний контроль якості. Окрім підтвердження чистоти (>99%), критично важливим є визначення вмісту активованої форми – FXIIIa (<0,5%). Це здійснюється за допомогою високочутливого флуоресцентного аналізу з використанням субстрату-маркера моноданзилкадаверину. Фактор XIII є

проферментом. Його активна форма (FXIIIa) працює як «біологічний клей», зшиваючи молекули білка. Маркер використовується як штучний донор аміногрупи. FXIIIa переносить моноданзилкадаверин на залишок глютаміну в білку-субстраті (найчастіше використовується казеїн або фібриноген). Флуоресцентна мітка ковалентно приєднується до білка. Після завершення реакції інтенсивність флуоресценції, що включилася в білок, вимірюється за допомогою флуориметра. Чим яскравіше свічення, тим вища активність ферменту. Залишкові білки дріжджів контролюються методом ELISA, де граничне значення <math><1-50</math> мільйонних часток (ppm) свідчить про надзвичайно високу ефективність стадій очищення [39, 58, 69].

Висновок до 3 розділу

Проведено комплексний аналіз систем експресії для виробництва рекомбінантного фактора згортання крові XIII (rFXIII), з акцентом на субодиницю A як цільовий продукт, з огляду на її терапевтичну значущість при дефіциті FXIII. На основі літературних даних та схеми прийняття рішень обґрунтовано вибір дріжджової системи *Saccharomyces cerevisiae* як оптимальної платформи. Ця система поєднує економічну доцільність, високу продуктивність, здатність до коректного фолдингу та відсутність потреби в складних посттрансляційних модифікаціях, які не є критичними для функціональності rFXIII-A (відсутність глікозилування, наявність лише двох дисульфідних зв'язків на мономер). Порівняльний аналіз альтернативних систем (*E. coli*, клітини ссавців, комах, рослинні та безклітинні) підтверджує, що дріжджі перевершують за критеріями масштабованості, стабільності та економічності, уникаючи проблем з імуногенністю гіперманнозних гліканів шляхом цитоплазматичної експресії.

Технологія виробництва rFXIII-A, адаптована з промислових процесів (Novo Nordisk, аналіз наукових статей та патентів), включає етапи молекулярного клонування з вектором pD16 (промотор ADH2-4с, маркер POT1), підготовку селективних і ферментаційних середовищ, двоетапну

ферментацію з глюкозно-етанольним підживленням, механічний лізис клітин, багатоступінчасте очищення (аніонообмінна хроматографія, кристалізація з ацетатом натрію, гідрофобна хроматографія, рН-преципітація, гель-фільтрація) та фінальну ліофілізацію. Цей процес забезпечує чистоту >99%, вміст rFXIIIa <0,5% та контамінацію дріжджовими білками <1-50 ppm, відповідаючи фармацевтичним стандартам.

Запропонована технологія є перспективною для виробництва. Ці результати стануть базою для подальшої оптимізації очищення та вирощування клітин у лабораторії для створення вітчизняного аналогу препарату rFXIII.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження присвячене аналізу біотехнологічних аспектів виробництва рекомбінантного фактора згортання крові XIII (rFXIII), з фокусом на субодиницю A як ключовий терапевтичний продукт для лікування рідкісного вродженого дефіциту FXIII. Встановлено, що FXIII відіграє критичну роль у стабілізації фібринового згустку, запобігаючи геморагічним ускладненням, таким як спонтанні кровотечі, внутрішньочерепні геморагії та порушення загоєння ран. Його структура (гетеротетрамер A_2B_2 у плазмі, гомодимер A_2 у клітинах) та генетика (гени F13A1 та F13B з поліморфізмами) визначають функціональність, а дефіцит, переважно субодиниці A, вимагає замісної терапії.

Аналіз препаратів крові показав, що плазмові продукти ефективні, але несуть ризики інфекцій та імуногенності, тоді як рекомбінантні забезпечують чистоту >99%, відсутність вірусних забруднень та стабільність, покращуючи якість життя пацієнтів з коагулопатіями. В Україні зареєстровані обмежені препарати факторів крові, але відсутні спеціалізовані для FXIII, що підкреслює актуальність розробки вітчизняних технологій для зменшення імпортозалежності.

Обґрунтування системи експресії на основі схеми прийняття рішень підтверджує вибір дріжджової платформи *Saccharomyces cerevisiae* (штам ZM118 з вектором pD16) як оптимальної для rFXIII-A: вона забезпечує евкаріотичний фолдинг без зайвих посттрансляційних модифікацій (відсутність глікозилювання), високу продуктивність, економічність. Запропонована технологія виробництва включає клонування (вектор pD16 з промотором ADH2-4с), підготовку середовищ, ферментацію з глюкозно-етанольним підживленням, лізис (гомогенізація високого тиску), очищення (аніонообмінна хроматографія, кристалізація ацетатом натрію, гідрофобна хроматографія, рН-преципітація, гель-фільтрація) та отримання готової форми (концентрація, стерилізація, ліофілізація). Цей процес гарантує чистоту >99%, вміст FXIIIa <0,5% та контамінацію дріжджовими білками <1-50 ppm.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вільчевська К. В. Гемофілія в Україні: проблеми, досягнення та перспективи. *Health-ua.com*. 2021. URL: <https://health-ua.com/article/65639-gemoflyya-vukran-problemi-dosyagnennya-taperspektivi> (дата звернення: 22.10.2025).
2. Всі рецептурні препарати : Biopharma. URL: <https://biopharma.ua/products> (дата звернення: 25.10.2025)
3. Державний реєстр лікарських засобів України : офіційний сайт. URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%F0%E8%F2%F3%EA%F1%E8%EC%E0%E1> (дата звернення: 15.11.2025).
4. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. для студентів біотехнологічних спец. Харків : Друкарня Мадрид, 2022. 151 с.
5. Настанова з лікування гемофілії / А. Шривастана та ін. 3-тє вид. ; Всесвітня федерація гемофілії. Київ, 2020. 190 с. URL: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1922.pdf> (дата звернення: 05.12.2025).
6. Півень О. О., Скоробогатова З. М. Сучасні інструменти редагування геному з основами молекулярної генетики : навч. посіб. Київ : Біокомполіт, 2021. 178 с.
7. Про безпеку та якість донорської крові та компонентів крові : Закон України від 12.01.2022 р. № 1962-IX. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/931-20#n249> (дата звернення: 05.12.2025).
8. Про затвердження порядку контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів : Наказ МОЗ України від 09.03.2010 р. № 211. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0368-10#Text> (дата звернення: 05.12.2025).
9. Про затвердження Порядку скринінгу донорської крові та її компонентів

- на гемотрансмісивні інфекції : Наказ МОЗ України від 19.02.2013 р. № 134. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0365-13#Text> (дата звернення: 22.10.2025).
10. Про лікарські засоби : Закон України від 28 лип. 2022 р. № 2469-IX. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2469-20#Text> (дата звернення: 05.12.2025).
11. Про затвердження Положення про контроль за відповідністю імунобіологічних препаратів, що застосовуються в медичній практиці, вимогам державних та міжнародних стандартів : Постанова Кабінету Міністрів України від 15 січ. 1996 р. № 73. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/73-96-%D0%BF#Text> (дата звернення: 25.10.2025).
12. Шапран Ю. П. Біотехнологія, генна інженерія : навч.-метод. посіб. Переяслав-Хмельницький : Домбровська Я., 2019. 132 с.
13. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production / A. Schütz et al. *A Cell Press journal*. 2023. Vol. 3. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102572.
14. Acquired factor XIII deficiency. A scoping review / D. Olivier et al. *European Journal of Anaesthesiology and Intensive Care*. 2023. Vol. 2(5). P. e0035. DOI: 10.1097/EA9.0000000000000035.
15. Advances and challenges in the purification of recombinant coagulation factors: A review / Y. Linling et al. *Journal of Chromatography A*. 2024. Vol. 1716. P. 464-662. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.464662.
16. Advances in biopharmaceutical products for hemophilia / J. Wu et al. *iScience*. 2024. Vol. 27(12). 111436. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111436.
17. Alshehri F. S. M., Whyte C. S., Mutch N. J. Factor XIII-A: An Indispensable «Factor» in Haemostasis and Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22(6). DOI: 10.3390/ijms22063055.
18. Amino acid sequence of the A subunit of human factor XIII / A. Ichinose et al. *Biochemistry*. 1986. Vol. 25(22). P. 6900-6906. DOI: 10.1021/bi00370a025.

19. Amino acid sequence of the B subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments / A. Ichinose et al. *Biochemistry*. 1986. Vol. 25(16). P. 4633-4638. DOI: 10.1021/bi00364a027.
20. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis / N. Komanasin et al. *J Thromb Haemost*. 2005. Vol. 3. P. 2487–2496, 2005. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01624.x.
21. Application of mechanistic modelling in membrane and fiber chromatography for purification of biotherapeutics - A review / Y. Qu et al. *Journal of Chromatography A*. 2024. Vol. 1716. DOI: 10.1016/j.chroma.2023.464588.
22. BBa_K4297002. ADH2: IGEM Registry of Standard Biological Parts. URL: <https://registry.igem.org/parts/bba-k4297002> (Date of access: 20.11.2025).
23. Blood coagulation factor XIII and factor XIII deficiency / A. Dorgalaleh, J. Rashidpanah. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/coagulation-factor-xiii> (Date of access: 01.10.2025)
24. Blood products. *World Health Organisation*. URL: https://www.who.int/health-topics/blood-products#tab=tab_1 (Date of access: 20.11.2025).
25. Board P. G. Genetic polymorphism of the B subunit of human coagulation factor XIII. *Am J Hum Genet*. 1980. Vol. 32. P. 348–353.
26. Board P. G., Pierce K., Coggan M. Expression of functional coagulation factor XIII in *Escherichia coli*. *Thromb Haemost*. 1990. Vol. 63. P. 235–240.
27. Broker M., Bauml O. New expression vectors for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett*. 1989. Vol. 248. P. 105–110.
28. Carrell N. A., Erickson H. P., McDonagh J. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J Biol Chem*. 1989. Vol. 264. P. 551–556.
29. Critical Evaluation of Strategies for the Production of Blood Coagulation Factors in Plant-Based Systems / O. Top et al. *Frontiers in Plant Science*. 2019.

- Vol. 10. P. 261. DOI: 10.3389/fpls.2019.00261.
30. Congenital factor XIII deficiency: Orphanet. URL: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/331> (Date of access: 20.11.2025).
 31. dbSNP : National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (Date of access: 05.11.2025).
 32. Different Expression Systems for Production of Recombinant Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* / Z. Liu et al. *Biotechnol Bioeng.* 2012. Vol. 109(5). P. 1259–1268. DOI: 10.1002/bit.24409.
 33. Distinct C-terminus of the B subunit of factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems / H. Iwata et al. *J Thromb Haemost.* 2009. Vol. 7. P. 1084–1091. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03443.
 34. Dorey E. First recombinant Factor XIII approved. *Nature Biotechnology.* 2014. Vol. 32. P. 210.
 35. Duckert F., Jung E., Shmerling D. H. A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. *Thromb Diath Haemorrh.* 1960. Vol. 5. P. 179–186.
 36. Duval C., Phiuppou H., AriëNs R. A. S. Factor XIII. URL: <https://oncohemakey.com/factor-xiii/> (Date of access: 10.12.2025).
 37. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* / Z. Meirong et al. *Microb Cell Fact.* 2024. Vol. 23(32). DOI: 10.1186/s12934-024-02299-z.
 38. EU/3/16/1752 - orphan designation for treatment of haemophilia A: European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-16-1752> (Date of access: 05.12.2025).
 39. Expression, purification, and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae* / P. D. Bishop et al. *Biochemistry.* 1990. Vol. 29(7). P. 1861–1869.
 40. Factor XIII: A Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions / L. Muszbek et al. *Physiological Reviews.* 2011. Vol. 91(3). DOI:

- 10.1152/physrev.00016.2010.
41. Factor XIII, A subunit, deficiency of: OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man. URL: <https://omim.org/help/about> (Date of access: 05.12.2025).
 42. Factor XIII Deficiency : study guide from / A. Mangla et al. StatPearls : Treasure Island, 2024. URL: <https://europepmc.org/article/NBK/nbk557467> (Date of access: 20.11.2025).
 43. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a huge review and meta-analysis / P. S. Wells et al.. *Am J Epidemiol.* 2006. Vol. 164. P. 101–109.
 44. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis / Z. Voko et al. *Thromb Haemost.* 2007. Vol. 97. P. 458–463.].
 45. Fibrinase. I. Purification of substrate and enzyme. A. G. Loewy et al. *J Biol Chem.* 1961. Vol. 236. P. 2625–2633.
 46. Fibrinase. II. Some physical properties. A. G. Loewy et al. *J Biol Chem.* 1961. Vol. 236. P. 2634–2643.
 47. Gao J., Hooker B. S., Anderson D. B. Expression of functional human coagulation factor XIII A-domain in plant cell suspensions and whole plants. *Protein Expr Purif.* 2004. Vol. 37. P. 89–96.
 48. Hemostasis and bleeding disorders Organisation. URL: https://www.amboss.com/us/knowledge/Hemostasis_and_bleeding_disorders (Date of access: 20.11.2025).
 49. High level expression in yeast / ZYMOGEN ETiCS INC. Patent 0284044.
 50. Hyunah K., Yoo S. J., Ah Kang H.. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research.* 2014. Vol. 15(1). DOI:10.1111/1567-1364.12195.
 51. Jagadeeswaran P., Reddy S. V., Haas P. Synthesis of human coagulation factor XIII in yeast. *Gene.* 1990. Vol. 86. P. 279–283.
 52. Joint United Kingdom (UK) Blood Transfusion and Tissue Transplantation Services Professional Advisory Committee. URL: <https://www.transfusionguidelines.org/transfusion-handbook/3-providing->

- safe-blood/3-3-blood-products (Date of access: 20.11.2025).
53. Identification of Potential Novel Interacting Partners for Coagulation Factor XIII B (FXIII-B) Subunit, a Protein Associated with a Rare Bleeding Disorder / S. Singh et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20(11), 2682. DOI: 10.3390/ijms20112682
54. Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21 / G. L. Terol et al. *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.682001.
55. Impaired dimer assembly and decreased stability of naturally recurring R260C mutant A subunit for coagulation factor XIII / S. Maeda et al. *J Biochem.* 2012. Vol. 152(5). P. 471–478. DOI: 10.1093/jb/mvs088.
56. Leifheit H. J., Cleve H. Analysis of the genetic polymorphism of coagulation factor XIII B (FXIII B) by isoelectric focusing. *Electrophoresis*. 1988. Vol. 9. P. 426–429.
57. Loewy A. G., Veneziale C., Forman M. Purification of the factor involved in the formation of urea-insoluble fibrin. *Biochim Biophys Acta*. 1957. Vol. 26. P. 670–671.
58. Muszbek L., Ariens R. A., Ichinose A. Factor XIII: recommended terms and abbreviations. *J Thromb Haemost.* 2007. Vol. 5. P. 181–183. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02182.x
59. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information Human. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236299/> (Date of access: 05.12.2025).
60. Natural selection and the molecular basis of electrophoretic variation at the coagulation F13B locus / A. W. Ryan et al. *Eur J Hum Genet.* 2009. Vol. 17. P. 219–227. DOI: 10.1038/ejhg.2008.137.
61. NovoThirteen. catridecacog. European Medicine Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/novothirteen> (Date of access: 05.12.2025).
62. NovoThirteen 2500 IU powder and solvent for solution for injection. Annex I.

- Summary of product characteristics. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novothirteen-epar-product-information_en.pdf (Date of access: 05.12.2025).
63. Nugent D. Corifact™/Fibrogammin® P in the prophylactic treatment of hereditary factor XIII deficiency: results of a prospective, multicenter, open-label study. *Thromb. Res.* 2012. № 2. P. 12–14. DOI: 10.1016/S0049-3848(13)70005-7.
64. Overview of Recombinant Protein Expression Systems / E. Dudek et al. 2024. URL: https://futurefields.io/blogs/flylab/overview-of-recombinant-protein-expression-systems?srsId=AfmBOorm8I5NaQWrlCuT_Az_Irb9DQu31oWN2dPLH0ypZ4V3k-MfGcwH. (Date of access: 12.10.2025).
65. P00488. F13A_HUMAN : UniProt. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00488/entry> (Date of access: 11.12.2025).
66. Part:BBa_K2365051. TPI1 promotor : Registry of Standard Biological Parts. URL: https://parts.igem.org/Part:BBa_K2365051 (Date of access: 20.12.2025).
67. Practical Hemostasis and Thrombosis / Edited by Denise O’Shaughnessy, Michael Makris, David Lillicrap. USA, Massachusetts : Blackwell Publishing, Inc., 2005. 237 p.
68. Purification and characterization of recombinant human coagulant factor XIII A-chains expressed in *E. coli* / T. S. Lai et al. *Protein Expr. Purif.* 1994. Vol. 5(2). P. 125–132. DOI: 10.1006/prev.1994.1019.
69. Purification of factor XIII / M. Laustsen, J.-J. Chang, P. D. Bishop, G. W. Lasser. Patent EP0603215B1.
70. Recombinant FXIII (rFXIII-A 2) Prophylaxis Prevents Bleeding and Allows for Surgery in Patients with Congenital FXIII A-Subunit Deficiency / M. Carcao et al. *Thromb. Haemost.* 2018. Vol. 118(3). P. 451–460. DOI: 10.1055/s-0038-1624581.
71. Secretory expression of the α -subunit of human coagulation factor XIII in the

- yeast *Pichia pastoris* / D.-S. Park et al. *Biotechnology Letters*. 2002. Vol. 24(2). P. 97-101.
72. Stable expression of recombinant human coagulation factor XIII in protein-free suspension culture of Chinese hamster ovary cells / B.-H. Chun et al. *Cytotechnology*. 2001. Vol. 37. P. 179–187
73. Shi D.-Y., Wang Sh.-J. Advances of Coagulation Factor XIII. *Chin Med J*. 2017. Vol. 130(2). P. 219–223. DOI: 10.4103/0366-6999.198007.
74. Souri M., Kaetsu H., Ichinose A. Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry*. 2008. Vol. 47. P. 8656–8664.
75. Structural evidence that the activation peptide is not released upon thrombin cleavage of factor XIII / V. C. Yee et al. *Thromb Res*. 1995. Vol. 78. P. 389–397.
76. Swiech K., Picanço-Castro V., Covasb D. T. Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells? *Bioengineered*. 2017. Vol. 8(5). P. 462–470. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5639856/> (Date of access: 20.11.2025).
77. TEF1 translation elongation factor EF-1 alpha [*Saccharomyces cerevisiae* S288C] : National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/856195> (Date of access: 20.12.2025)
78. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure / R. A. Ariens et al. *Blood*. 2000. Vol. 96. P. 988–995.
79. Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII / Yee et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. Vol. 91. P. 7296–7300.
80. Tretten®. Catridecacog. Recombinant Coagulation Factor XIII A-Subunit / Product monograph including patient medication information. Novo Nordisk, Canada. URL: <https://www.novonordisk.ca/content/dam/nncorp/ca/en/products/tretten-product-monograph.pdf> (Date of access: 05.12.2025).
81. Tretten® Coagulation factor XIII A-subunit (recombinant). URL:

<https://www.tretten.com/> (Date of access: 05.12.2025).

82.U.S. Food and Drug Administration, FDA, USFDA. URL: <https://www.fda.gov/> (Date of access: 20.11.2025).

83.Weiss M. S., Metzner H. J., Hilgenfeld R. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Lett.* 1998. Vol. 423. P. 291–296.

84.World Federation of Hemophilia. URL: <https://wfh.org/> (Date of access: 20.11.2025).

ДОДАТКИ





МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ



СЕРТИФІКАТ
учасника
№162

Цим засвідчується, що

Винокурова М. Є.

брав(ла) участь у роботі V Міжнародної
науково-практичної конференції
**«ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ
СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ»**
(тривалість - 8 год)
28 березня 2025 р., м. Харків, Україна



В.о. ректора НФаУ,
д. фарм. н., проф. 

Проректор з НФаУ,
д. фарм. н., проф. 

Завідувачка кафедри
біотехнології НФаУ,
д. фарм. н., проф. 

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Наталія ХОХЛЕНКОВА



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ГРАМОТА

нагороджується

Винокурова Марія

у секційному засіданні студентського наукового
товариства кафедри
біотехнології

VI Всеукраїнська науково-практична конференція з
міжнародною участю

«YOUTH PHARMACY SCIENCE»

Ректор закладу
вищої освіти



(Signature)
Олександр КУХТЕНКО

10-11 грудня 2025 р. м. Харків





МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ДИПЛОМ

II СТУПЕНЯ

нагороджується

Марія ВІНОКУРОВА

із науковою роботою
**«Аналіз технологій отримання рекомбінантного фактору
крові VIII»**

(науковий керівник: *Калюжная О.С.*, к. фарм. н., доц.,
кафедра біотехнології)

у I етапі Всеукраїнського конкурсу студентських
наукових робіт зі спеціальності
"Біотехнології та біоінженерія"

В.о. ректора
Національного фармацевтичного
університету
Голова конкурсної комісії



Алла КОТВИЦЬКА

23-24 квітня 2025 р.
м. Харків

